

Aus der 2. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses  
Berlin-Neukölln

Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

---

DIE EINWIRKUNG VON VINCRISTINSULFAT AUF MENSCHLICHES  
KNOCHENMARK IN VITRO

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde  
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnärztin Inge Metzner geb. Albert  
aus Dresden

1976



Aus der 2. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses  
Berlin-Neukölln

Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

---

DIE EINWIRKUNG VON VINCRISTINSULFAT AUF MENSCHLICHES  
KNOCHENMARK IN VITRO

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde  
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnärztin Inge Metzner geb. Albert  
aus Dresden

Referent: Prof. Dr. med Irene Ball

Korreferent: Prof. Dr. med Hermann Michel

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Zahn-, Mund-  
und Kieferheilkunde  
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 14. 5. 1976

## INHALT

|                                   | Seite |
|-----------------------------------|-------|
| A. Einleitung                     | 5     |
| B. Material und Methode           | 11    |
| C. Experimentelle Ergebnisse      | 16    |
| Versuchsreihe I                   | 17    |
| Versuchsreihe II                  | 26    |
| Versuchsreihe III                 | 32    |
| Versuchsreihe IV                  | 35    |
| D. Zusammenfassung der Ergebnisse | 39    |
| E. Diskussion                     | 46    |
| F. Zusammenfassung                | 53    |
| Literaturverzeichnis              | 54    |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

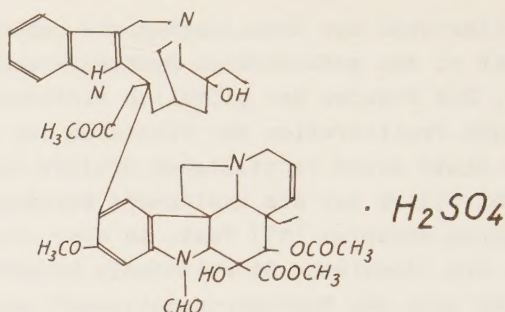
## A. EINLEITUNG

Die Hämoblastosen der Granulocytopoese gehören durch ihre Malignität zu den gefürchteten Systemerkrankungen des Menschen. Die Ursache der plötzlich eintretenden, überschießenden Proliferation der Vorstufen der Leukocyten kann bis heute nicht befriedigend erklärt werden. Mit Sicherheit steht bisher nur die auslösende Wirkung von Röntgen- und atomaren Strahlen (41) fest. Da aber nicht bei jedem Menschen die identische Strahlendosis krankheitsauslösend wirkt, und auch der Erkrankungszeitpunkt nach der Strahlenexposition differiert, liegt die Annahme nahe, daß es sich bei der Auslösung der Leukämie um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Die Bemühungen, die Hämoblastosen therapeutisch zu bekämpfen, konnten deshalb bisher nur symptomatisch sein. Allgemein durchgesetzt haben sich hier die Cytostatica, die durch direkte Mitosehemmung auf unterschiedliche Zellteilungsstufen wirken. In ihre Reihe gehört das Vincristin (VCR). In Deutschland unter dem Namen Oncovin<sup>R</sup> im Handel, ist das VCR ein aus der Wurzel der in Ostafrika und Madagaskar beheimateten Immergrünpflanze *Vinca rosea* Linn extrahiertes Alkaloid (31).

Es wurde zunächst als Leurocristin (LCR) (44) bekannt, wurde später hauptsächlich Vincristin genannt und ist in der Literatur mit den Abkürzungen - VCR sowie LCR - anzutreffen.

VCR wurde, nachdem man es bei experimentell verursachten Mäuse -Leukämien (45) erfolgreich als Cytostaticum einsetzen konnte, 1961 erstmals klinisch erfolgreich bei menschlichen Leukämien angewandt (24,25).

Die chemische Strukturformel von VCR ist bekannt (36).



Es handelt sich um ein Indol-Hydroindol-Alkaloid mit der empirischen Formel  $C_{46}H_{54}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$ . Die Strukturformel ist fast identisch mit VELBE (VLB), das ebenfalls aus der Wurzel der Immergrünpflanze *Vinca rosea* extrahiert wird. Anstelle der Methylgruppe in VCR weist das VLB jedoch eine Formylgruppe auf.

Therapeutisch haben VCR und VLB verschiedene Indikationen (39). Bei Tierversuchen mit Mäusen konnte CARDINALI (9) jedoch bei einer kombinierten Behandlung mit VCR und VLB einen größeren antimittotischen und cytostatischen Effekt auslösen als mit einem Medikament allein.

VCR ist als Mitosegift eine zytostatisch wirksame Substanz und wird zur Einleitung der Remission (7,8,16,20,22,32,38) und zur Erhaltung einer Remission, insbesondere bei akuten Leukämien appliziert. KLEIN et al. (26) empfehlen asynchron proliferierende Tumorzellen durch Gabe von VCR in eine synchrone Phase zu überführen, so daß andere Zytostatika (z.B. Cyclophosphamid), die vorwiegend in der S-Phase wirken, sinnvoll therapeutisch angewandt werden können. MARMONT (34) stellt anhand von Reihenuntersuchungen bei an Leukämie Erkrankten fest, daß die größte Sensibilität gegen VCR-Gabe bei akuten Lymphoblastenleukämien vorliegt, da die Mitoseindices nach VCR-Gabe bei Lymphoblastenleukämie im Gegensatz zu anderen akuten Leukämiearten enorm gestiegen waren. Die geringste Mitosesteigerung weist die akute Myeloblastenleukämie nach VCR-Gabe auf.

Die Angaben über die Dosierung schwanken. Nach Empfehlung der pharmazeutischen Firma LILLY wird VCR in wöchentlichen Abständen i.v.verabreicht. Bei akuten Leukämien wurden Remissionen mit wöchentlichen Dosen von 0,05 mg - 0,15 mg/kg Körpergewicht erzielt (8). Andere Dosisangaben liegen zwischen 0,01 bis 0,10 mg/kg 1-3 mal wöchentlich (7,43). Ist eine Remission eingetreten, wird empfohlen, eine Erhaltungsgabe von 0,05 - 0,075 mg/kg weiter zu verabreichen, um die Remission möglichst lange aufrecht zu erhalten. So ist nach VAITKEVICIUS (47) bei kontinuierlicher Erhaltungsgabe die Remissionszeit erheblich zu verlängern.

Begrenzender Faktor für eine Fortsetzung der Behandlung mit VCR sind die Nebenwirkungen, die oft ein Absetzen des Medikamentes notwendig machen. OBRECHT und KENDEL (37) berichten von einer dosisabhängigen Schädigung des Nervensystems mit neuromuskulären Störungen, Parästhesien, Neuritiden und Reflexverminderung. SLATER (42) beschreibt einen Krankheitsverlauf, bei dem am 7. Tag nach VCR-Gabe eine interkurrente Hämaturie, am 10. Tag ein paralytischer Ileus, am 14. Tag grand mal Anfälle mit prolongiertem Koma für 5 Tage auftraten. Durchgehend beobachtet er eine Hyponatriämie, Serum-Hypoosmolarität sowie hyperosmolaren Urin. Sämtliche Symptome sind nach Absetzen des Medikamentes reversibel und werden als spezielle VCR-Toxizität gedeutet. Alopecia, Obstipation und neurologische Erscheinungen sind ebenfalls nach Absetzen der Therapie reversibel (8,16,22,32,39).

MORASCA et al. (35) und VALERIOTE (48) berichten von einer raschen Verstoffwechselung und Inaktivierung des VCR bei Rattenversuchen. Die biologische Aktivität nach hohen i.p. Dosen erreicht bereits nach einer Stunde ein Maximum im Rattenserum und fällt anschließend exponentiell rapid ab. Die Ausscheidung der aktiven Metaboliten erfolgt überwiegend über Leber und Galle (2).

MORASCA et al. (35) weisen eine maximale cytotoxische Wirksamkeit des VCR auf leukämisch verändertes, kind-

liches Knochenmark 2 Std. nach der VCR Applikation ( $5 \cdot 10^{-2}$  µg VCR/ml) nach. Die "KB"-Zellen werden in der Metaphase blockiert. Eine Teilblockade der Metaphasen wird bei einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-3}$  µg/ml sichtbar, bei  $5 \cdot 10^{-4}$  µg/ml ist keine Reaktion mehr beobachtet worden.

Die cytostatische Wirksamkeit des VCR wird als eine irreversible Blockierung im Sinne des stathmokineticen Effektes zum Zeitpunkt der Metaphase verstanden (11,17). Der Begriff "Spindelblocker" ist dabei rein morphologisch deskriptiv und macht keine Aussagen über den wahren cytotoxischen Wirkungsmechanismus. Er beschreibt lediglich den letzten Schritt von verschiedenen vorangegangenen Stoffwechselvorgängen. Elektronoptisch sieht man, daß Mikrotubuli zerstört werden (21,30).

Der biochemische Wirkungsmechanismus ist bisher ungeklärt. Auf Grund der fehlenden systematischen Chromosomenanordnung zur Metaphasenplatte wird eine Synthesestörung der spezifischen Spindelproteine angenommen. Histologische Gewebsschnittuntersuchungen der Epidermis, unmittelbar nach Beendigung der Therapie entnommen, weisen über corialen leukotischen Infiltraten multiple, in der Metaphase arretrierte Mitosen auf (15,46).

In der Wirkung auf die Spindel ist der Sinn der fraktionierten Applikation zu sehen (11,17). Da VCR die Zellproliferation ausschließlich in der Metaphase hemmt und nur ein geringer Prozentsatz im Laufe der Einwirkungszeit des VCR sich in der empfindlichen Phase befindet, wird bei einmaliger Dosis unabhängig von der Dosishöhe die Proliferation der Zellen nur gering hemmend beeinflusst. Die Zahl der arretierten Mitosen nach einmaliger VCR-Gabe ist somit weniger abhängig von der Dosishöhe als von der Teilungsaktivität der Zellen. Ein additiver Effekt auf die Mitosen kann nur mit wiederholter Gabe des Pharmakons erreicht werden (13). In den langen Pausen haben die normalen Granuloblasten wieder Zeit zur Erholung (4).

GEBHART et al. (18) stellen an Chromosomenuntersuchungen bei 4 mit VCR behandelten Patienten fest, daß gegenüber Kontrollpersonen gehäuft Aberrationen auftauchen in Form von Spiralisierungsdefekten sowie Pulverisierung einzelner Chromosomen und tetraploide Metaphasenbildung, sowie Achromasien. Der von CARDINALI (10) beschriebene stathmokinetiche Effekt des VCR wird durch die Versuche von GEBHART bestätigt. Nach seinen Angaben sind die Spiralisierungsdefekte und Chromosomenerosionen Sekundärfolgen der stathmokinetiche Wirkung.

Auch nach kinematographischen Phasenkontrastaufnahmen ist selbst nach hoher VCR-Gabe nur die Metaphase arretiert. Nach Auseinanderwanderung der Chromosomen sind die He-La-Zellen vor VCR geschützt (19). Im elektronenoptischen Bild fehlen geordnete Spindelfasern in allen VCR-gehemmten Zellen. Die Chromatinmasse wird unregelmäßig verteilt. GEORGE (19) nimmt an, daß die Zellmembran nur in der Metaphase für die Alkaloide permeabel ist. Er zeigt, daß Prophasezellen lediglich durch Auswaschen des cytotostaticahaltigen Mediums vor der Metaphasenstörung geschützt werden und eine normale Mitose durchlaufen.

Von CREASEY et al. (12) werden außerdem eine starke Einbauhemmung der RNS, insbesondere der t-RNS-Synthese aufgezeigt. Der Eingriff der Vincaalkaloide in den Protein- und Aminosäure-Stoffwechsel wird von JOHNSON et al. (23) nachgewiesen: Durch Zugabe von Glutaminsäure, Asparaginsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, Ornithin, Citrullin, Arginin wurde die cytotostatische Wirksamkeit von VCR unterbunden. Da aber keine Strukturverwandtschaft der zugegebenen Stoffe untereinander vorliegt und die erforderliche Metabolitdosis zu hoch ist, sind FUSENIG und OBRECHT (17) nicht geneigt, den VCR-Effekt im Sinne eines antimetabolischen Wirkungsmechanismus zu interpretieren.

LAMPERT (27) geht in seinen Untersuchungen mit Hilfe der Feulgenmikrospektrophotometrie auf die Größenzunahme der erythropoetischen Zellen unter VCR ein. Er zeigt, daß beim

gesunden Knochenmark der Kernvergrößerung eine DNS-Verdoppelung zugrunde liegt. Diese Beziehung trifft auf die über längere Zeit oder bei Überdosierung mit VCR-gehemmte Erythropoese nicht zu, sie weist in der DNS-Kerngrößenbeziehung eine negative Allometrie auf. Der DNS-Gehalt ist geringer als die Kerngrößenzunahme. LAMPERT nimmt daher an, daß die DNS-Synthese bei einer mit VCR behandelten Zellpopulation herabgesetzt ist.

Um weitere Aufklärung über die Wirkungsweise des VCR zu erlangen, soll im Rahmen dieser Arbeit eine Untersuchung über die Beeinflussung des menschlichen normalen und leukämisch veränderten Knochenmarks durch VCR erfolgen. Um gleiche Voraussetzungen zu schaffen, wurde die Untersuchung in vitro durchgeführt. Wir haben dadurch die Gewißheit, daß die individuelle Konstitution des menschlichen Organismus in vivo, durch humorale und nervale Faktoren gesteuert, ausgeschaltet werden konnte. Unter identischen Versuchsbedingungen werden nach festgelegten Bebrütungszeiten verschiedene Knochenmarkproben in Reinkultur und nach Zusatz von VCR miteinander verglichen. Zur Beurteilung der Proliferation in Granulocyto- und Erythropoese wird die Regeneration mit Hilfe von Mitose-Indices und karyologischen Kurven erfaßt. Außerdem kann der Effekt des Mitoseblocks auf die Zelltransformation durch Differentialzählung verschiedener Stichproben der Kultur und Aufzeichnung von Reifungskurven und G/E-Indices erstmals dargestellt werden.

## B. MATERIAL UND METHODE

Als Versuchsmaterial dient das durch Sternalpunktion gewonnene Knochenmark. Es werden außer einem Originalausstrich Knochenmarkkulturen mit der Carrel'schen Methode, in der von BOLL (4) vereinfachten Form angelegt. Durch Nährstofflösungszusätze können die Zellen in ihrer ursprünglichen Form vital bleiben.

Mischtropfen aus 40 % Nativplasma, 50 % Serum und 10 % Corhormon werden auf sterile Deckgläser gegeben und koagulieren. Ein kleiner Serumbtropfen und jeweils ein Knochenmarkbröckel werden auf die entstandenen Koagulate gesetzt. Die so beschickten Deckgläser werden auf einen Hohlsliffobjektträger gebracht und mit Paraffin luftundurchlässig verschlossen. Die Züchtung erfolgt im hängenden Tropfen bei 37°C im Brutschrank. Als Versuchs- (VCR) und Kontrollkulturen (K) dienen Tochterkulturen der gleichen Knochenmarkproben.

Die Gruppierung I bis IV ergibt sich aus den unterschiedlich angewandten VCR-Dosierungen. Die weitere Einteilung in 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 bezeichnet jeweils eine abgeschlossene Untersuchungsserie einer Knochenmarkprobe eines einzelnen Patienten.

Die Knochenmarkkulturen werden wie folgt beschickt:

- 1) Kontrollkulturen ohne Zusatz
- 2) Kulturen mit 0,00005 µg/ml in Anlehnung an Versuche von SIEBS (40), VALERIOTE et al. (48) und WILLMS (49) (I. Versuchsreihe, 3 Fälle)
- 3) Kulturen mit 0,05 µg/ml VCR in Anlehnung an Versuche von MARMONT et al. (33) (II. Versuchsreihe, 2 Fälle)
- 4) Kulturen mit 0,5 µg/ml VCR in Anlehnung an Tierversuche von CARDINALI (11) (III. Versuchsreihe, 1 Fall)
- 5) Kulturen mit 3,3 µg/ml VCR in Anlehnung an Versuche von GEBHART (18) (IV. Versuchsreihe, 1 Fall)

Bei 6 Patienten wurden nach 24, 48, 72-stündigem Wachstum, bei einem dieser 6 Patienten außerdem nach 96 h Bebrütungs-dauer Ausstriche angefertigt. Bei einem 7. Patienten erfolgten Ausstriche nach 8, 22, 30, 48 und 72 h. Die Ausstriche werden an der Luft getrocknet und nach Pappenheim gefärbt. Von jedem panoptisch gefärbten Ausstrichpräparat werden 1000 bis 2000 Zellen in der übersichtlichen peripheren Zone differenziert. Die Differenzierung erfolgt nach den von BOLL (4,6) aufgestellten morphologischen Kriterien:

In der Erythropoese unterscheiden wir fünf Entwicklungsstadien:

- Proerythroblast (PR)
- Basophiler Erythroblast (BE)
- Polychromatischer Erythroblast (PE)
- Oxyphiler Erythroblast (OE)
- Reifer Erythroblast (RE)

In der Granulopoese werden folgende Zellgruppen differenziert:

- Myeloblast (MB)
- Promyelocyt (PM)
- Neutrophiler Myelocyt (MC)
- Eosinophiler Myelocyt (EOM)
- Basophiler Myelocyt (BM)
- Promonocyt (PMo)
- Metamyelocyt (MM)
- Jugendlicher Granulocyt (J)
- Stabkerniger Granulocyt (STG)
- Neutrophiler segmentkerniger Granulocyt (SG)
- Eosinophiler Granulocyt (EOG)
- Basophiler Granulocyt (BG)
- Monocyt (Mo)

Zusätzlich wurden aus dem retikulohistiocytären System die Retikulumzellen - in große und kleine - und die Plasmazellen differenziert.

Neben der morphologischen Zelldiagnostik kommt die Mitose-Phasenbestimmung zur Auswertung. Nach BOLL (3) werden 6 Stufen beobachtet:

1. Prophase, 2. Frühe Metaphase, 3. Späte Metaphase,
4. Anaphase, 5. Telophase, 6. Rekonstruktionsphase.

ad 1. Prophase (P): Die Kernmembran und Nucleoli sind aufgelöst. Die aufgelockerten Chromosomen sind im festen Spirem sichtbar.

ad 2. Frühe Metaphase (fM): Aus dem festen Spirem der Prophase wurde ein aufgelockertes. Die Chromosomen liegen ungeordnet über die Zelle verstreut.

ad 3. Späte Metaphase (sM): Die Chromosomen teilen sich und ordnen sich zum Monaster bzw. zur Äquatorialplatte an.

ad 4. Anaphase (A): Der sternförmig angeordnete Doppelchromosomensatz hat sich geteilt und voneinander entfernt und bildet einen Diaster.

ad 5. Telophase (T): Die Chromosomen fügen sich zu einem lockeren Dispirem zusammen. Eine Einschnürung des Zellplasmas wird deutlich.

ad 6. Rekonstruktionsphase (R): Die Teilung der Ausgangszelle ist vollständig. Zwei identische Chromosomensätze haben sich in je einer Zelle zu einem festen Spirem zusammengefügt. Die Nucleoli und die Kernmembran haben sich noch nicht ausgebildet.

Mit Hilfe der Differentialzählergebnisse werden

1. Reifungskurven und
2. karyologische Kurven aufgestellt,
3. der G/E-Index und
4. die Mitose-Indices (MI) bestimmt.

ad 1. Die Reifungskurven geben Auskunft über die prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellformen in der Zeiteinheit. Es werden für die Erythropoese und Granulopoese

getrennt graphische Darstellungen angefertigt. Im Koordinatenkreuz wird prozentual auf der Abszisse die Zellart additiv aufgetragen, auf der Ordinate ist die Dauer der Bebrütungszeit der Kultur dargestellt, die maximal 96 h beträgt. Bei der Beurteilung der Reifungskurven der Kontrollversuche gilt als Maßstab die normale Hämatopoese nach BOLL (4,5,6)

- ad 2. Die karyologische Kurve gibt die prozentuale Mitosephasenverteilung, getrennt nach Erythropoese und Granulopoese wieder.
- ad 3. Der G/E-Index gibt Aufschluß über das Verhältnis der Zellanzahl der gesamten Granulopoese zur Anzahl der differenzierten Erythroblasten. Er ergibt sich aus der Zahl aller granulopoetischen Zellen geteilt durch die Zahl aller Erythroblasten.
- ad 4. Der Mitoseindex beschreibt die Anzahl der gefundenen Mitosen bezogen auf die Gesamtzahl aller gezählten teilungsfähigen Zellen in pro mille. Der rote Mitose-Index (rMI) bezieht sich ausschließlich auf das erythropoetische System, der weiße Mitose-Index (wMI) auf das granulopoetische System. Als teilungsfähige Zellen gelten sämtliche Zellen der Erythropoese bis auf die reifen Erythroblasten. In der Granulopoese sind es sämtliche Granuloblasten, angefangen mit den Myeloblasten bis zu den Myelocyten und Metamyelocyten. Während der Mitose ist eine Differenzierung von Metamyelocyten und Myelocyten wegen der Plasmaidentität unmöglich. Es werden die Metamyelocyten daher den Myelocyten zugeordnet.

Erläuterungen zu den Abbildungen 1-8:

Abb. 1 - 7      zeigen die Reifungskurven

----- =      Kontrollkultur ohne Zusatz

———— =      Kulturen mit Vincristinzusatz .

Abb. 8           zeigt die karyologischen Kurven der Mitosephasen-  
verteilung

----- =      Mitosen in Kontrollkulturen der

1. Erythropoese

2. Granulopoese

———— =      Mitosen in den Kulturen mit Vincristinzusatz

1. Erythropoese

2. Granulopoese

## C. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

Es wurden insgesamt 65 601 Zellen ausgewertet.

### Zellmorphologie:

Die Originalausstrichpräparate zeigen im allgemeinen nur wenig morphologische Zellveränderungen in den verschiedenen Zellentwicklungsstadien. Bei Versuch 3 variiert die Myeloblastengröße stark und erreicht manchmal die Größe eines Promyelocyten. Bei längerer Bebrütungsdauer der Knochenmarkkulturen machen sich jedoch morphologisch Degenerationerscheinungen schon in den Kontrollkulturen bemerkbar. Fixierungsschäden treten auf und lassen sich nicht von den degenerierten Zellen unterscheiden.

Die Differentialzählung wird besonders bei den Zusatzkulturen mit Vincristin nach längerer Bebrütungsdauer problematisch, da offensichtlich Wachstums- und Teilungsstörungen sowie Zelldegeneration im fortgeschrittenen Zeitabschnitt vermehrt eintreten. Zellen in Gänseblümchenform werden bei Versuch 7 beobachtet. Die ursprünglich eingeplante Differentialzählung nach 96 h Bebrütungsdauer wurde abgebrochen, weil die Zellzahl, die beurteilt werden konnte, zu gering war. Es fällt auf, daß die Konzentration von 0,00005 µg/ml Testsubstanz weniger Zellveränderungen verursachte als die höhere Vincristin-Konzentration.

Es wurden innerhalb von vier Versuchsreihen mit vier unterschiedlichen VCR-Konzentrationen 7 verschiedene Knochenmarkproben inkubiert:

|                  |                                 |
|------------------|---------------------------------|
| Versuchsreihe I  | VCR-Konzentration 0,00005 µg/ml |
|                  | Knochenmarkpunktat 1            |
|                  | 2                               |
|                  | 3                               |
| Versuchsreihe II | VCR-Konzentration 0,05 µg/ml    |
|                  | Knochenmarkpunktat 4            |
|                  | 5                               |

Versuchsreihe III VCR-Konzentration 0,5 µg/ml  
Knochenmarkpunktat 6

Versuchsreihe IV VCR-Konzentration 3,3 µg/ml  
Knochenmarkpunktat 7

### Versuchsreihe I

In der ersten Versuchsreihe wurde das Sternalmark von 3 Patienten mit 0,00005 µg/ml VCR inkubiert.

#### Versuch 1 (Abb.1)

Versuch 1 wurde mit dem Knochenmarkpunktat der Patientin R.H., 42 Jahre, durchgeführt. Die klinische Diagnose lautete: Promonocytenleukämie. Eine cytostatische Therapie hatte bis zum Zeitpunkt der Sternalpunktion nicht stattgefunden.

Blutbild (18.3.71) zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

|                 |              |                |                |
|-----------------|--------------|----------------|----------------|
| Erythrocyten:   | 3,02 Mill/µl | Leukocyten:    | 1920/µl        |
| Hb              | 10,4 g%      | Stabkernige    | 1 relativ (%)  |
| Hb <sub>E</sub> | 34 pg        | Segmentkernige | 10 relativ (%) |
|                 |              | Lymphocyten    | 4 relativ (%)  |
|                 |              | Monoblasten    | 14 relativ (%) |
| Thrombozyten    | 86 000/µl    | Monozyten      | 71 relativ (%) |

Im Versuch 1 ergeben sich folgende Mitose-Indices:

weißer Mitose-Index:

| 0 h  | 24 h |      | 48 h |     | 72 h |     |
|------|------|------|------|-----|------|-----|
|      | K*   | VCR* | K    | VCR | K    | VCR |
| 16,3 | 1,0  | 2,3  | 1,5  | 0   | 0    | 3,2 |

roter Mitose-Index:

|      |   |      |     |   |     |   |
|------|---|------|-----|---|-----|---|
| 22,7 | 0 | 41,6 | 5,1 | 0 | 5,8 | 0 |
|------|---|------|-----|---|-----|---|

\* K = Kontrolle  
VCR = Vincristinezusatz

Die Anzahl der Mitosen sinkt in der Granulopoese nach VCR-Gabe, in der Erythropoese erhöht sie sich gering. Die Verteilung der Mitosephasen ist nicht charakteristisch für VCR-Einwirkung.

|           | Zahl der Mitosen |              |
|-----------|------------------|--------------|
|           | Granulopoese     | Erythropoese |
| Kontrolle | 27               | 3            |
| VCR       | 2                | 4            |

|              | Verteilung der Mitosephasen (%) |     |    |     |    |     |    |     |    |     |   |     |
|--------------|---------------------------------|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|---|-----|
|              | P                               |     | fM |     | sM |     | A  |     | T  |     | R |     |
|              | K                               | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K | VCR |
| Granulopoese | 22                              | 50  | 11 | 0   | 59 | 50  | 7  | 0   | 0  | 0   | 0 | 0   |
| Erythropoese | 0                               | 0   | 0  | 0   | 0  | 25  | 66 | 50  | 33 | 25  | 0 | 0   |

Bei Betrachtung der Zellverteilung im Originalausstrich wird in der Erythropoese eine leichte Linksverschiebung durch Erhöhung des Proerythroblastenanteils und der basophilen Erythroblasten bemerkt. Diese Vermehrung der unreifen roten Zellen hat zwangsläufig eine prozentuale Verminderung der reiferen Erythroblasten zur Folge, der polychromatischen und oxyphilen sowie der reifen Erythroblasten.

In der Granulopoese sind bei etwa einem Viertel aller Zellen Promonocyten und bei knapp drei Viertel Monocyten beobachtet worden. Außerdem ist ein minimaler Anteil von ca. 1 % stabkernigen und ca. 2 % segmentkernigen Granulocyten zu differenzieren. Der G/E-Index ist 20,95.

Reifung der Granulopoese in vitro: Nach 24-stündiger Bebrütung werden in der Kontrollkultur keine Monocyten beobachtet. Die Promonocyten haben nach 24 Stunden rapid zuge-

VCR 0,00005 µg/ml

# ERYTHROPOESE

# GRANULOPOESE

r MI  
227

RE 100%  
GE-INDEX  
20,95

WMI  
13,3

0 2h 48h 72h

PR BE PE

PMO STG SG

0 50 100%

0 2h 48h 72h

1107  
920

10 23

0 2h 48h 72h

350  
160

15 0

0 2h 48h 72h

449  
213

0 32

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

0 2h 48h 72h

nommen. Es treten Myeloblasten auf, die jedoch nach 48 Stunden Einwirkungszeit nicht mehr beobachtet werden. Der 2. Kulturtag weist fast wieder die Ausgangsverteilung auf, so daß ein technischer Fehler für die starke Veränderung nach 24 h in Erwägung gezogen werden muß. Die Reifung der Promonocyten zu Monocyten hält nach 72-stündiger Bebrütung weiter an. Die Ausreifung der Promonocyten, damit gleichzeitig ihre Abnahme, bedingt zwangsläufig eine Vermehrung der Monocyten.

Die Testkultur mit 0,00005 µg/ml Vincristin beeinflußt die Granulopoese insofern, als nach 24 h Bebrütung keine Myeloblasten im Präparat auftauchen. Es werden fast ausschließlich Promonocyten beobachtet. Nach 48 h Einwirkung verursacht die Testsubstanz eine geringfügige Promonocytenvermehrung, nach 72 h nähert sich die Kurve wieder den Kontrollwerten.

Reifung der Erythropoese in vitro: Die 24 Stunden Kontrollkultur weist so wenig Erythroblasten auf (G/E 71), daß auf eine Auswertung der Zellverteilung zu diesem Zeitpunkt verzichtet wird. Am 2. Kulturtag wird eine Zellausreifung sichtbar.

Proerythroblasten werden nicht mehr beobachtet. Der Anteil basophiler Erythroblasten ist stark vermindert. Die polychromatischen Erythroblasten sind anteilmäßig konstant geblieben. Fast 50 % der Zellen der Erythropoese sind zu oxyphilen und reifen Erythroblasten ausdifferenziert. Diese Ausreifungstendenz hält, weniger ausgeprägt als nach 48-stündiger Bebrütung, am dritten Kulturtag bei den reiferen Erythroblasten an. Die polychromatischen Erythroblasten nehmen etwas ab, während die basophilen Erythroblasten relativ vermehrt sind.

Die Kultur mit einem Zusatz von 0,00005 µg/ml zeigt nach 24 h eine klare Linksverschiebung. Am 2. Bebrütungstag fällt eine starke Vermehrung der polychromatischen Erythroblasten gegenüber den Kontrollwerten auf. Hier vermindert sich der Zellanteil der basophilen und oxyphilen Erythro-

blasten. Die Prozentwerte der reifen Erythroblasten entsprechen den Werten in der Kontrollkultur. Nach 72 Stunden werden nur noch polychromatische, oxyphile sowie reife Zellen gefunden. Gegenüber dem Kontrollbefund zu diesem Zeitpunkt sind die polychromatischen stärker vorhanden, oxyphile sind vermindert und die reifen Erythroblasten sind kaum vermindert.

### Versuch 2 (Abb.2)

Die nächste Versuchsreihe - mit der gleichen Konzentration von 0,00005 µg/ml VCR wurde mit dem Sternalmark des 64-jährigen Patienten S.H. durchgeführt. Die klinische Diagnose lautete: aleukämische akute myeloische Leukämie. Cytostatische Behandlung hatte vor Entnahme des Untersuchungsmaterials nicht stattgefunden.

Blutbild (10.2.71) zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

|                 |              |                |                |
|-----------------|--------------|----------------|----------------|
| Erythrocyten:   | 2,70 Mill/µl | Leukocyten:    | 1370/µl        |
| Hb              | 8,8 g%       | Eosinophile    | 1 relativ (%)  |
| Hb <sub>E</sub> | 32,8 pg      | Myelocyten     | 9 relativ (%)  |
|                 |              | Jugendliche    | 11 relativ (%) |
|                 |              | Stabkernige    | 14 relativ (%) |
|                 |              | Segmentkernige | 46 relativ (%) |
| Thrombocyten    | 20 000/µl    | Lymphocyten    | 19 relativ (%) |

Im 2. Versuch ergeben sich folgende Mitose-Indices:

weißer Mitose-Index:

|                     | 0 h  |  | 24 h |      | 48 h |     | 72 h |     |
|---------------------|------|--|------|------|------|-----|------|-----|
|                     |      |  | K    | VCR  | K    | VCR | K    | VCR |
|                     | 12,1 |  | 6,7  | 1,7  | 13,2 | 0   | 0    | 0   |
| roter Mitose-Index: |      |  |      |      |      |     |      |     |
|                     | 24,0 |  | 0    | 16,6 | 3,2  | 0   | 0    | 0   |

Die Zahl der beobachteten Mitosen und ihre Phasenverteilung nach VCR-Einfluß ist nicht charakteristisch.

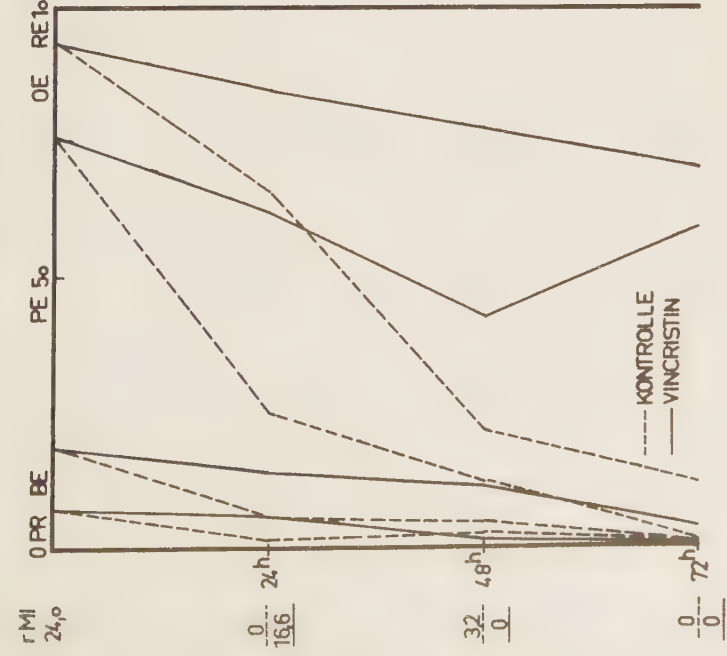
|           | Zahl der Mitosen |              |
|-----------|------------------|--------------|
|           | Granulopoese     | Erythropoese |
| Kontrolle | 19               | 5            |
| VCR       | 1                | 7            |

|              | Verteilung der Mitosephasen (%) |     |    |     |    |     |    |     |    |     |   |     |
|--------------|---------------------------------|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|---|-----|
|              | P                               |     | fM |     | sM |     | A  |     | T  |     | R |     |
|              | K                               | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K | VCR |
| Granulopoese | 5                               | 0   | 16 | 0   | 26 | 100 | 37 | 0   | 16 | 0   | 0 | 0   |
| Erythropoese | 0                               | 14  | 20 | 28  | 40 | 43  | 0  | 0   | 40 | 14  | 0 | 0   |

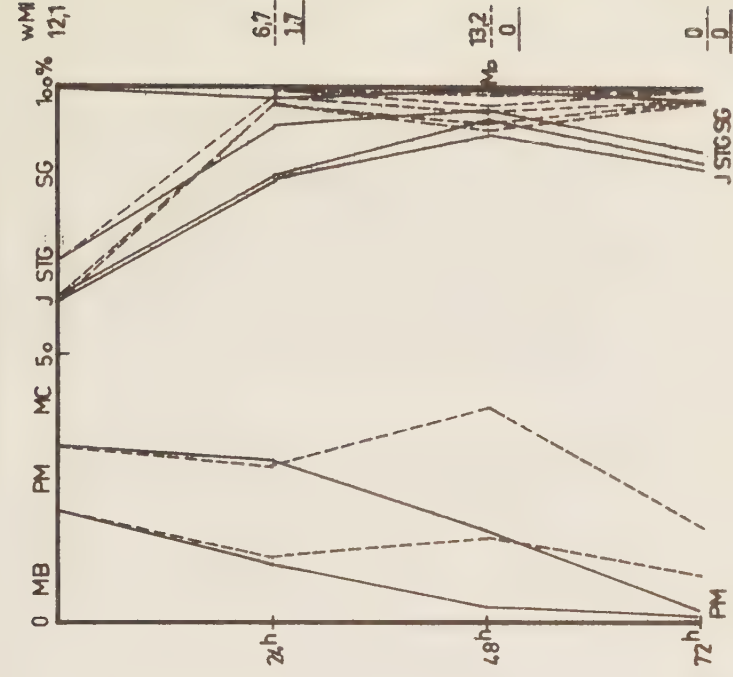
Das Myelogramm des Originalausstrichs ist in der Granulopoese linksverschoben. Es finden sich jedoch auch viele reife Granulocyten. Die Granulopoese ist insgesamt etwas vermehrt. Der G/E-Index beträgt 4,9. Die Erythropoese ist normal verteilt.

Reifung der Granulopoese in vitro: Nach 24-stündiger Bebrütungszeit wird in den Kontrollversuchen eine deutliche Vermehrung der Myelocyten sichtbar. Die ausgereiften Zellen, besonders die segmentkernigen, vermindern sich anzahlmäßig zu diesem Zeitpunkt. Während die Myeloblasten leicht abnehmen, vermehren sich die Promyelocyten um diesen Anteil. Am zweiten Bebrütungstag zeigt der Kurvenverlauf, daß sich die unreifen Blasten, die nach 24 Stunden Bebrütung dezimiert waren, im Kontrollversuch unter prozentualer Abnahme der Myelocyten vermehren. Die Anzahl der reifen Zellen bleibt annähernd unverändert. Nach dreitägiger Bebrütung tritt eine ähnliche Zellverteilung ein, wie sie nach 24 Stunden Bebrütung vorlag. Der Myelocytenanteil hat leicht zugenommen unter relativer Abnahme der Myeloblasten. Die Segmentkernigen sind fast verschwunden.

# ERYTHROPOESE



# GRANULOPOESE



Der Zusatz von 0,00005 µg/ml VCR verursacht nach 24 h eine vermehrte Ausreifung der Myelocyten zu stab- und segmentkernigen Zellen. Die Blasten bleiben anteilmäßig annähernd konstant. Nach 48 h Einwirkung der Testsubstanz zeigt sich eine deutliche Änderung in der Zellverteilung. Eine Myeloblasten- und Promyelocytenabnahme wird sichtbar, gleichzeitig nehmen die Myelocyten stark zu. Bei den Granulocyten treten nur unauffällige Änderungen ein. Die prozentuale Abnahme der Blasten bleibt nach 72 h erhalten. Der VCR-Zusatz erhöht den Granulocytenanteil.

Reifung der Erythropoese in vitro: Am ersten Kulturtag ist die relative Vermehrung der Erythropoese auffällig, sie ist an den gesunkenen G/E-Indices abzulesen, im Kontrollwert beträgt er 1,5 und in der Zusatzkultur 1,3. Nach einem Kulturtag ist in der Erythropoese ohne VCR-Zusatz eine starke Ausreifung zu verzeichnen. Diese hält auch nach 48 und 72 Stunden an und führt somit zu einer starken Vermehrung der reifen Erythroblasten.

Das VCR hemmt offensichtlich wieder die Ausreifung der Erythropoese. Die oxyphilen und reifen Erythroblasten nehmen gegenüber dem Kontrollbefund weniger zu. Dafür liegen die unreifen Erythroblasten vermehrt vor. Die reifungshemmende Wirkung hält auch am zweiten Bebrütungstag an. Am 3. Kulturtag wird eine sprunghafte Vermehrung der ohnehin schon durch VCR vermehrten polychromatischen Erythroblasten deutlich. Die ausgereiften Erythroblasten, die zu fast 90 % im Kontrollpräparat zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden, sind stark vermindert. Die Proerythroblasten, oxyphilen und basophilen Erythroblasten haben sich anteilmäßig unwesentlich verändert.

### Versuch 3 (Abb.3)

Die dritte Versuchsserie mit der Konzentration von 0,00005 µg/ml VCR wurde am Sternalmark der 63-jährigen Patientin L.G. vorgenommen. Die Patientin befand sich wegen einer Halslymphknoten-Tbc in stationärer Behandlung, als der Verdacht einer akuten Myeloblastenleukämie auftauchte. Dieser bestätigte sich. Sie wurde daraufhin neben der tuberculostatischen Therapie zusätzlich einer cytostatischen unterzogen.

Das für die Untersuchungsreihe verwendete Untersuchungsmaterial wurde nach bereits begonnener cytostatischer Therapie entnommen. Die Patientin wurde täglich mit 2 mal 60 mg Cytosin-Arabinosid sechs Tage lang behandelt. 3 Tage vor der Sternalpunktion wurde das Medikament abgesetzt.

Blutbild (17.3.71) zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

|                 |              |                |                |
|-----------------|--------------|----------------|----------------|
| Erythrocyten:   | 3,54 Mill/µl | Leukocyten:    | 2 300/µl       |
| Hb              | 11,2 g%      | Myeloblasten   | 87 relativ (%) |
| Hb <sub>E</sub> | 31,5 pg      | Myelocyten     | 3 relativ (%)  |
|                 |              | Segmentkernige | 2 relativ (%)  |
| Thrombocyten    | 5000/ µl     | Lymphocyten    | 8 relativ (%)  |

Im dritten Versuch werden folgende Mitose-Indices gefunden:

weißer Mitose-Index:

|                     | 0 h  |  | 24 h |      | 48 h |      | 72 h |     | 96 h |     |
|---------------------|------|--|------|------|------|------|------|-----|------|-----|
|                     |      |  | K    | VCR  | K    | VCR  | K    | VCR | K    | VCR |
|                     | 19,1 |  | 3,7  | 12,7 | 0    | 2,3  | 12,1 | 0   | -    | 0   |
| roter Mitose-Index: |      |  |      |      |      |      |      |     |      |     |
|                     | 0    |  | 9,5  | 0    | 10,7 | 17,6 | 4,7  | 0   | 0    | 0   |

Die Zahl der beobachteten Mitosen ist nach VCR-Gabe in der Granulopoese und der Erythropoese zurückgegangen. Die prozentuale Mitosephasenverteilung ist aus den folgenden Tabellen zu entnehmen.

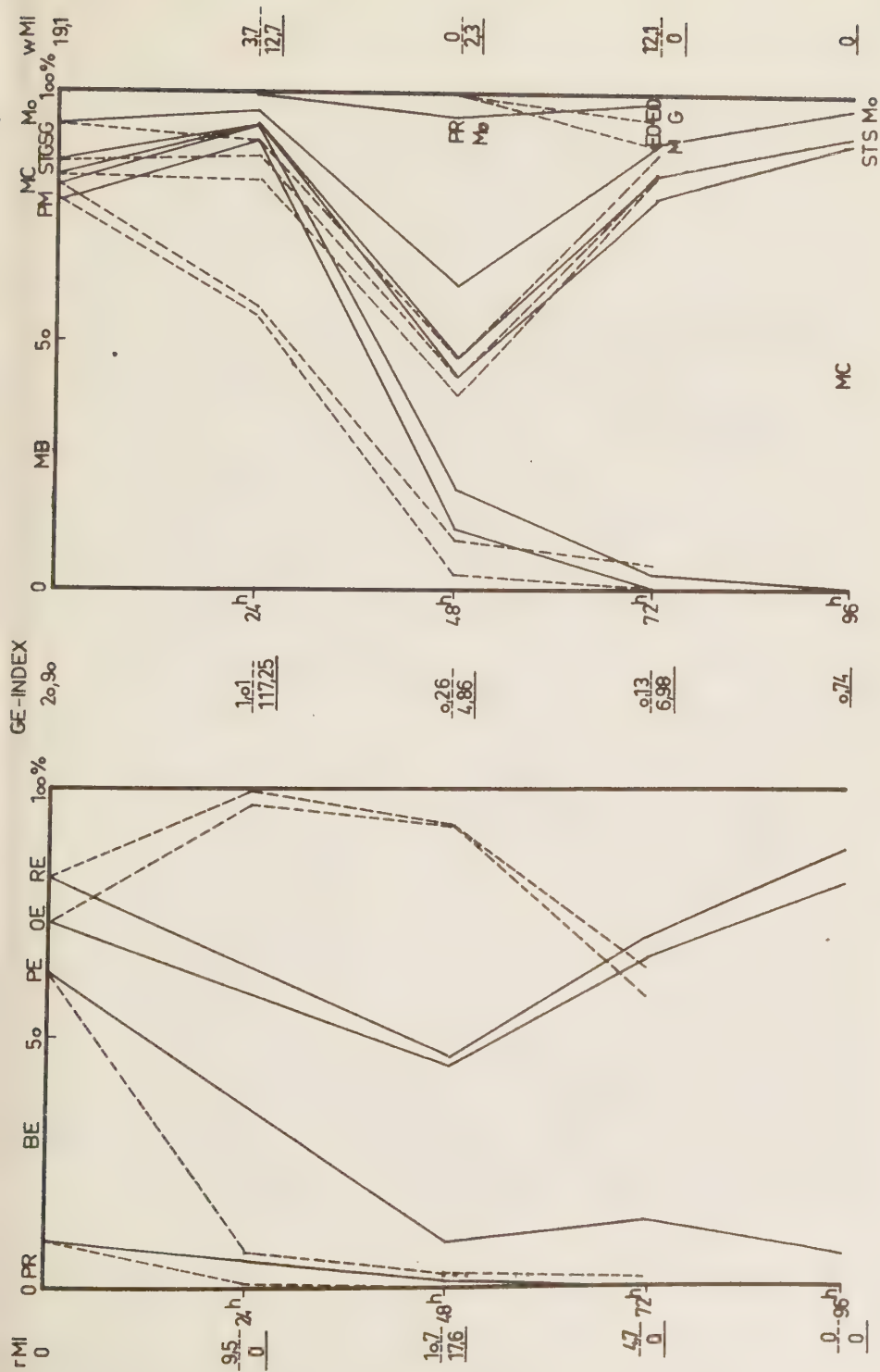
|           | Zahl der Mitosen |              |
|-----------|------------------|--------------|
|           | Granulopoese     | Erythropoese |
| Kontrolle | 21               | 16           |
| VCR       | 14               | 10           |

|              | Verteilung der Mitosephasen (%) |     |    |     |    |     |    |     |    |     |   |     |
|--------------|---------------------------------|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|---|-----|
|              | P                               |     | fM |     | sM |     | A  |     | T  |     | R |     |
|              | K                               | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K | VCR |
| Granulopoese | 24                              | 14  | 14 | 50  | 28 | 21  | 24 | 14  | 10 | 0   | 0 | 0   |
| Erythropoese | 19                              | 20  | 44 | 30  | 12 | 30  | 19 | 10  | 6  | 10  | 0 | 0   |

Das Myelogramm des Originalausstriches läßt annähernd eine normale Verteilung der im ganzen stark verminderten Erythropoese erkennen. In der Granulopoese wird dagegen eine ausgeprägte Linksverschiebung deutlich. Mit fast 80 % Myeloblasten liegt eine starke Blastenvermehrung vor.

In der Kontrollkultur der Granulopoese kommt es nach 24 - 48 h zur Abnahme des Myeloblastenanteils und gleichzeitig zu einer kontinuierlichen Zunahme der Myelocyten. Auffällig ist die prozentuale Vermehrung der Monocyten nach 48 h Bebrütungszeit, die sich am 3. Kulturtag jedoch zurückentwickelt, so daß nach 72 h Bebrütung weniger Monocyten beobachtet werden als im Sofortausstrich. Bei dieser Versuchsreihe mußte auf eine Zählung der Kontrollkultur nach 96 h verzichtet werden, da eine Zelldifferenzierung nicht mehr möglich war.

Nach VCR-Zugabe haben die Myeloblasten im Vergleich zu dem Kontrollbefund nach 24 h stark zugenommen. Die Vermehrung der Myelocyten, die in der Kontrolle beobachtet wurde, findet bei der Zusatzkultur nicht statt. Die Verzögerung der Ausreifung ist auch nach dem 2. Bebrütungstag deutlich erkennbar. Es liegen vermehrt Myeloblasten vor, die Pro-myelocyten entsprechen der Anzahl des Kontrollwertes. Die



Myelocyten sind nach Vincristinzugabe zu diesem Zeitpunkt vermindert. Bei den ausgereiften Zellen fällt eine Zunahme der Segmentkernigen und eine relative Abnahme der Monocyten nach 48 h auf. Nach 72 h Bebrütung nähern sich die Werte der Zusatzkultur den Werten der Kontrollkultur. Nach 96 h werden fast nur noch Myelocyten gefunden.

Erythropoese: In den Kontrollkulturen der Erythropoese kommt es nach 24-stündiger Bebrütung zu einer rasanten Abnahme der Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten. Die gleiche Abnahme zeigen die oxyphilen und reifen Erythroblasten, so daß zu diesem Zeitpunkt eine starke Zunahme der polychromatischen Erythroblasten zu erkennen ist. Am 2. Bebrütungstag bleibt der polychromatische Erythroblastenanteil prozentual konstant, Proerythroblasten und oxyphile Erythroblasten werden nicht beobachtet. Während die reifen Erythroblasten zunehmen, kommt es zum Verlust bei den basophilen Erythroblasten. Nach 72-stündiger Bebrütungszeit ergibt sich eine Ausreifung: Eine Verschiebung zu den reifen Zellformen ist in der Zellverteilung erkennbar.

In der Zusatzkultur mit VCR muß auf eine Auswertung der 24 h Bebrütung verzichtet werden, weil zu wenig Zellen der Erythropoese differenziert wurden (G/E-Index 117!). Nach 48 h Bebrütungsdauer ist eine Rechtsverschiebung eingetreten. Prozentual liegen mehr reife Zellen vor als im Kontrollpräparat. Nach 72 h zeigt die Ausreifung eine leicht rückläufige Tendenz. Es finden sich vermehrt basophile Erythroblasten und weniger oxyphile und reife Erythroblasten im Vergleich zum Kontrollbefund. Nach 96 Stunden wird eine Vermehrung der polychromatischen Zellen sichtbar. Die basophilen, oxyphilen und reifen Erythroblasten gehen anteilmäßig zurück. Hier gibt es keine vergleichbaren Kontrollwerte, die Aufschluß über die Vincristinzugabe machen könnten, weil zu wenig Zellen nach 4-tägiger Bebrütung der Kontrollen differenziert werden konnten.

## Versuchsreihe II

Die Knochenmarkproben der Versuche 4 und 5 wurden mit 0,05 µg/ml VCR inkubiert.

### Versuch 4 (Abb.4)

Die Versuchsreihe wurde aus dem Beckenkampunktat der 50-jährigen Patientin P.L. hergestellt. Die Patientin litt an einem metastasierenden Mamma-Carzinom, welches erstmals 1963 auftrat. Sie mußte sich wegen auftretender Recidive in den Jahren 1967, 1972 und 1973 (Februar-März) wiederholt einer Röntgentherapie unterziehen. Medikamentöse Therapie vor der Beckenkampunktion:

Täglich 3 mal 1 Tbl. Neuro-Fortabol<sup>R</sup>,  
alle 6 Stunden 20 Tropfen Dolantin<sup>R</sup>,  
3 mal 1 Drg. Ariven<sup>R</sup> pro die,  
Spasmo-Cibalgine<sup>R</sup> bei Bedarf

Blutbild (22.8.1973) zum Zeitpunkt der Beckenkampunktion:

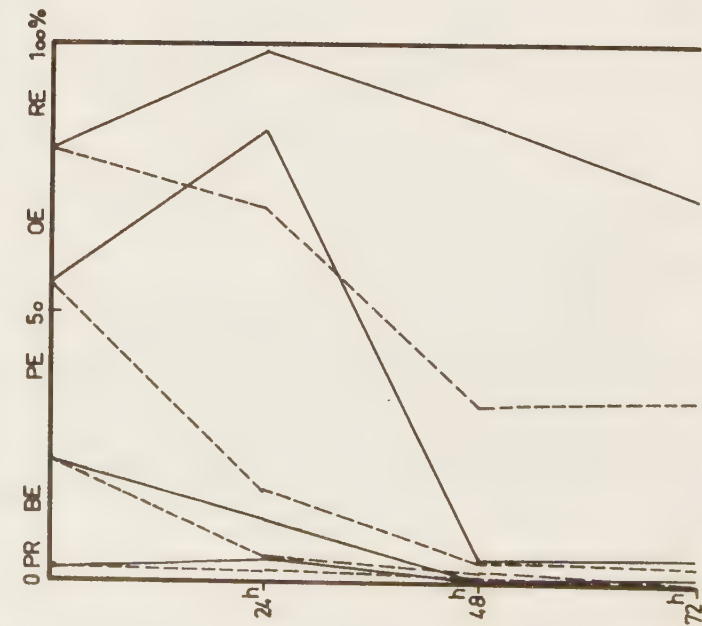
|                 |         |                |                |
|-----------------|---------|----------------|----------------|
| Erythrocyten    | 3,63/µl | Leukocyten     | 7600/µl        |
| Hb              | 23,4 g% | Eosinophile    | 1 relativ (%)  |
| Hb <sub>E</sub> | 33,8 pg | Stabkernige    | 11 relativ (%) |
|                 |         | Segmentkernige | 72 relativ (%) |
|                 |         | Monocyten      | 5 relativ (%)  |
|                 |         | Lymphocyten    | 11 relativ (%) |

In dieser Versuchsreihe ergeben sich folgende Mitose-Indices:

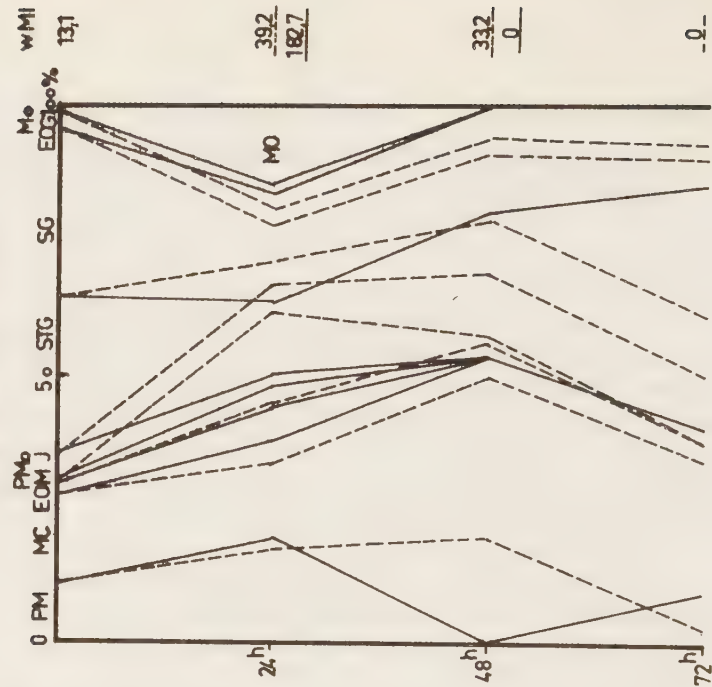
weißer Mitose-Index

|                    | 0 h  |  | 24 h |      | 48 h |     | 72 h |     |
|--------------------|------|--|------|------|------|-----|------|-----|
|                    |      |  | K    | VCR  | K    | VCR | K    | VCR |
|                    | 13,1 |  | 39,2 | 82,7 | 33,2 | 0   | 0    | 0   |
| roter Mitose-Index |      |  |      |      |      |     |      |     |
|                    | 0    |  | 2,6  | 38,8 | 0    | 4,0 | 0    | 0   |

# ERYTHROPOESE



# GRANULOPOESE



Die Zahl der Mitosen steigt in der Erythropoese nach VCR-Zugabe erheblich an, während sie in der Granulopoese annähernd gleich bleibt. Ihre Phasenverteilung ist aus der folgenden Aufstellung ersichtlich:

|           | Zahl der Mitosen |              |
|-----------|------------------|--------------|
|           | Granulopoese     | Erythropoese |
| Kontrolle | 20               | 3            |
| VCR       | 19               | 47           |

|              | Verteilung der Mitosephasen (%) |     |    |     |    |     |    |     |    |     |   |     |
|--------------|---------------------------------|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|---|-----|
|              | P                               |     | fM |     | sM |     | A  |     | T  |     | R |     |
|              | K                               | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K | VCR |
| Granulopoese | 25                              | 0   | 30 | 53  | 15 | 42  | 15 | 0   | 15 | 5   | 0 | 0   |
| Erythropoese | 0                               | 0   | 0  | 40  | 33 | 49  | 66 | 9   | 0  | 2   | 0 | 0   |

Die Zellverteilung des Beckenkampunktats ist im Originalausstrich bei einem erniedrigten G/E-Index von 1,4 in der Erythropoese und Granulopoese rechtsverschoben.

Im Verlauf der Kontrollkurve der Granulopoese fällt nach dem 1. Bebrütungstag die Abnahme der nicht mehr teilungsfähigen stab- und segmentkernigen Granulocyten zugunsten der Monocyten auf. Die unreifen Vorstufen, besonders die Promyelocyten, die eosinophilen Myelocyten und die Promonocyten haben zugenommen. Die Ausnahme bilden die Myelocyten, die anzahlmäßig zurückgegangen sind. Nach 48 h Bebrütungsdauer kommt es zu einer Vermehrung der Myelocyten und der jugendlichen Granulocyten sowie der stab- und segmentkernigen Granulocyten. Monocyten gehen zurück. Nach 72-stündiger Inkubation kommt es zur Ausreifung der Promyelocyten zu Myelocyten. Außerdem haben sich die segmentkernigen Granulocyten anzahlmäßig vermehrt.

Die Zugabe von 0,05 µg/ml VCR bewirkt nach 24 h Bebrütung eine leichte Vermehrung der Promyelocyten, die eosinophilen und neutrophilen Myelocyten nehmen ab, ebenso die Promonocyten. Eine bedeutende Zunahme ist bei den reifen Granulocyten, den stab- und segmentkernigen Zellen zu beobachten. Monocyten nehmen unter VCR-Einwirkung mäßig ab. Nach 48 h Bebrütung kommt es zur Vermehrung der Myelocyten auf Kosten der Promyelocyten, die zu dem Zeitpunkt auf Null zurückgehen. Die stab- und segmentkernigen Granulocyten sind abermals viel stärker vertreten als im vergleichbaren Kontrollpräparat. Nach 72 h Bebrütung hat sich der Myelocyten-Anteil dem des Kontrollwertes angeglichen. Die segmentkernigen Granulocyten liegen anteilmäßig unter dem Kontrollwert. Die stabkernigen Granulocyten haben zugenommen. Es läßt sich keine gezielte Beeinflussung durch VCR feststellen.

Die Erythropoese zeigt in den Kontrollkulturen mit fortschreitender Kulturdauer bis 48 h eine Zunahme der reifen Zellformen. Am 3. Bebrütungstag entspricht die Zellverteilung ungefähr der des 2. Kulturtages.

Die Kulturen mit 0,05 µg/ml VCR-Zusatz zeigen nach 24 h eine deutliche Vermehrung der unreifen Zellen, insbesondere der polychromatischen Erythroblasten. Die Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten sind mäßig erhöht. Ein Rückgang der oxyphilen und reifen Erythroblasten, also der stark entdifferenzierten Zellen, ist zu verzeichnen. Diese Reifungsverzögerung ist nach 48 h überwunden. Eine Ausreifung der polychromatischen zu oxyphilen und der oxyphilen zu reifen Erythroblasten wird im Kurvenverlauf deutlich. Am 3. Bebrütungstag hält die Tendenz zur Reifung an, wobei die Werte der Kontrolle nicht erreicht werden. Ausgehend vom 24 h Wert läßt sich eine eindeutige Reifungszunahme unter VCR herleiten.

# Versuch 5 (Abb.5)

Die nächste Versuchsreihe wurde unter Zugabe von 0,05 µg/ml VCR mit dem Sternalpunktat des 41-jährigen W.P. durchgeführt. Der Patient litt unter einer metastasierenden Carcinose mit unbekanntem Primärtumor.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

3 x 2 Drg. Reparil<sup>R</sup> pro die  
 3 x 50 mg Drg. Melleril<sup>R</sup> pro die  
 zur Nacht: Mandrax<sup>R</sup> 1 Tbl.  
                   1 Amp. Dolantin S. <sup>R</sup>  
                   10 mg Valium

Blutbild (7.7.1973) zum Zeitpunkt des Sternalpunktats:

|                 |         |                |                |
|-----------------|---------|----------------|----------------|
| Erythrocyten    | 3,88/µl | Leukocyten     | 700/µl         |
| Hb              | 12,0 g% | Jugendliche    | 1 relativ (%)  |
| Hb <sub>E</sub> | 30,8 pg | Stabkernige    | 1 relativ (%)  |
|                 |         | Segmentkernige | 73 relativ (%) |
|                 |         | Lymphocyten    | 22 relativ (%) |
|                 |         | Monocyten      | 3 relativ (%)  |

Aus der 5. Versuchsreihe entnehmen wir folgende Mitose-Indices:

weißer Mitose-Index:

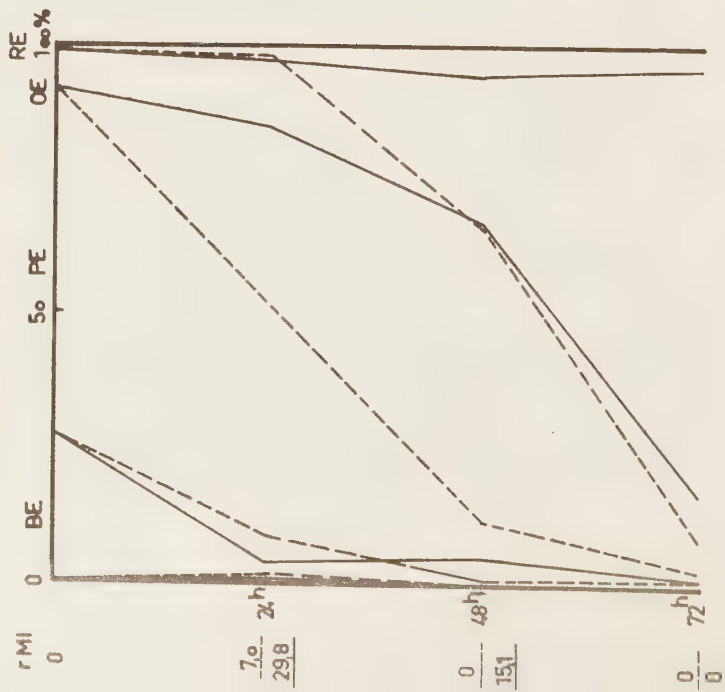
| 0 h | 24 h |      | 48 h |      | 72 h |     |
|-----|------|------|------|------|------|-----|
|     | K    | VCR  | K    | VCR  | K    | VCR |
| 0   | 45,6 | 77,6 | 20,8 | 19,6 | 36,5 | 0   |

roter Mitose-Index:

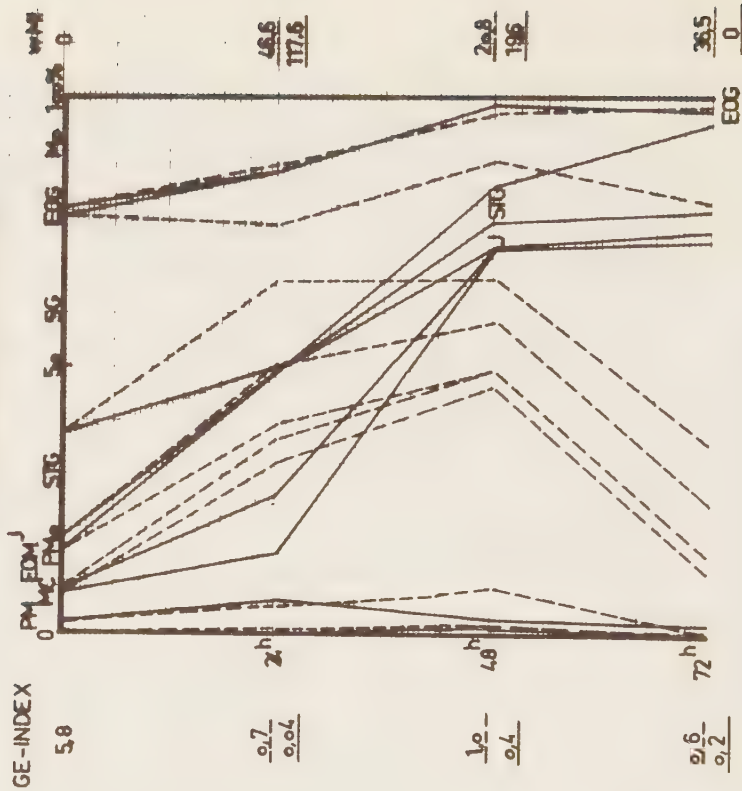
|   |   |      |   |      |   |   |
|---|---|------|---|------|---|---|
| 0 | 7 | 29,8 | 0 | 15,1 | 0 | 0 |
|---|---|------|---|------|---|---|

Die Anzahl der Mitosen sinkt nach VCR-Gabe in der Granulopoese ab. In der Erythropoese kommt es zu einem enormen Anstieg der Mitosen, es werden ausschließlich Zellen beobachtet, die sich in der Metaphase befinden. Die Phasenverteilung ist aus der folgenden Tabelle abzulesen.

# ERYTHROPOESE



# GRANULOPOESE



Zahl der Mitosen

|           | Granulopoese | Erythropoese |
|-----------|--------------|--------------|
| Kontrolle | 19           | 4            |
| VCR       | 7            | 23           |

Verteilung der Mitosephasen (%)

|              | P  |     | fM |     | sM |     | A  |     | T  |     | R |     |
|--------------|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|---|-----|
|              | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K | VCR |
| Granulopoese | 32 | 0   | 37 | 0   | 10 | 100 | 10 | 0   | 10 | 0   | 0 | 0   |
| Erythropoese | 0  | 0   | 50 | 0   | 0  | 100 | 50 | 0   | 0  | 0   | 0 | 0   |

Im Originalausstrich fällt in der Erythropoese eine Vermehrung der basophilen und polychromatischen Erythroblasten auf. Proerythroblasten sind nicht vorhanden. Reife Erythroblasten kommen kaum vor. In der Granulopoese ist eine Monocytenvermehrung bei erheblicher Verminderung der teilungsfähigen Vorstufen sichtbar. Der G/E-Index beträgt 5,8.

Die Reifungskurve der Granulopoese ergibt ohne Zusatz von VCR folgendes Bild: In den ersten 24 h der Inkubation in vitro überwiegt die Zellteilung der Granuloblasten, so daß sich mit der Zunahme der Granuloblasten eine Rechtsverschiebung der Kurven zeigt. Die stab- und segmentkernigen Granulocyten nehmen ab. Nach 48 h Bebrütung werden vorwiegend die Myelocyten vermehrt. Segmentkernige nehmen anzahlmäßig zu, stabkernige vermindern sich. Nach 72 h kommt es zu einer weiteren Progression der Zellausreifung, die sich in der Abnahme der Promyelocyten, der Myelocyten und in einer Vermehrung der segmentkernigen Zellen äußert.

Monocyten sind vermehrt im Sofortausstrich zu beobachten (20 %). Sie nehmen kontinuierlich im Laufe der 72 h ab. Es werden nur noch wenige am 3. Kulturtage beobachtet.

Durch 0,05 µg/ml VCR-Einfluß verringert sich nach 24 h Bebrütung der Myelocyten-Anteil. Eosinophile Myelocyten und Promonocyten vermehren sich deutlich. Der Anteil der segmentkernigen Zellen ist bedeutend höher als im vergleichbaren Kontrollpräparat. Nach 48 h ist eine Zunahme der Myelocyten zu ersehen. Ausgereifte Zellen, besonders jugendliche und stabkernige Granulocyten sind stark reduziert. Die Zellverteilung verändert sich am 3. Bebrütungstag nur noch gering. Der Einfluß von VCR hat eine Reifungshemmung zur Folge.

In den Kontrollkulturen der Erythropoese findet eine Zunahme der reifen und oxyphilen Erythroblasten bis zum 2. Bebrütungstag statt. Gleichzeitig nehmen die unreifen Vorstufen ab. Am 3. Bebrütungstag werden über 90 % reife Erythroblasten beobachtet.

Die Kurven mit 0,05 µg/ml VCR-Zusatz zeigen hingegen am 1. Kulturtag eine Zunahme der polychromatischen Erythroblasten. Oxyphile und basophile Erythroblasten sind vermindert, reife Erythroblasten annähernd konstant geblieben. Nach 48 h geht die Anzahl der polychromatischen Erythroblasten etwas zurück. Sie liegt aber weit über dem Wert der Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt. Oxyphile Erythroblasten nehmen zu. Der vergleichbare Kontrollwert liegt jedoch doppelt so hoch. Reife Zellen sind kaum vorhanden. Auch am 3. Bebrütungstag werden nur wenige reife Erythroblasten beobachtet. Am stärksten sind nun oxyphile Erythroblasten vertreten, aber auch polychromatische Erythroblasten liegen vermehrt vor.

### Versuchsreihe III

#### Versuch 6 (Abb.6)

Die nächste Versuchsreihe wurde mit 0,5 µg/ml VCR inkubiert und mit dem Sternalpunktat des 74-jährigen Patienten R.H. durchgeführt. Anamnestisch gibt der Patient an, vor Jahren einen Morbus Hodgkin gehabt zu haben. Die stationäre Einweisung erfolgte jetzt wegen Verdachts auf einen Lungenabszeß.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

Täglich Novodigal<sup>R</sup> 2 x 1 Tabl.

Anabactyl<sup>R</sup> 4 x 5,0 g pro die

Refobacin<sup>R</sup> 2 x 40 mg pro die

Blutbild (15.1.1974) zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

|                 |         |                |                |
|-----------------|---------|----------------|----------------|
| Erythrocyten    | 3,07/µl | Leukocyten     | 29 400/µl      |
| Hb              | 8,5 g%  | Eosinophile    | 1 relativ (%)  |
| Hb <sub>E</sub> | 27,6 pg | Stabkernige    | 7 relativ (%)  |
|                 |         | Segmentkernige | 75 relativ (%) |
|                 |         | Lymphocyten    | 9 relativ (%)  |
|                 |         | Monocyten      | 8 relativ (%)  |

Im 6. Versuch liegen folgende Mitose-Indices vor:

weißer Mitose-Index:

| 0 h | 24 h |      | 48 h |      | 72 h |     |
|-----|------|------|------|------|------|-----|
|     | K    | VCR  | K    | VCR  | K    | VCR |
| 8,4 | 65,2 | 43,2 | 17,5 | 31,1 | 11,3 | 5,1 |

roter Mitose-Index:

|     |      |       |     |      |     |      |
|-----|------|-------|-----|------|-----|------|
| 9,9 | 24,2 | 108,8 | 2,3 | 24,9 | 5,3 | 80,3 |
|-----|------|-------|-----|------|-----|------|

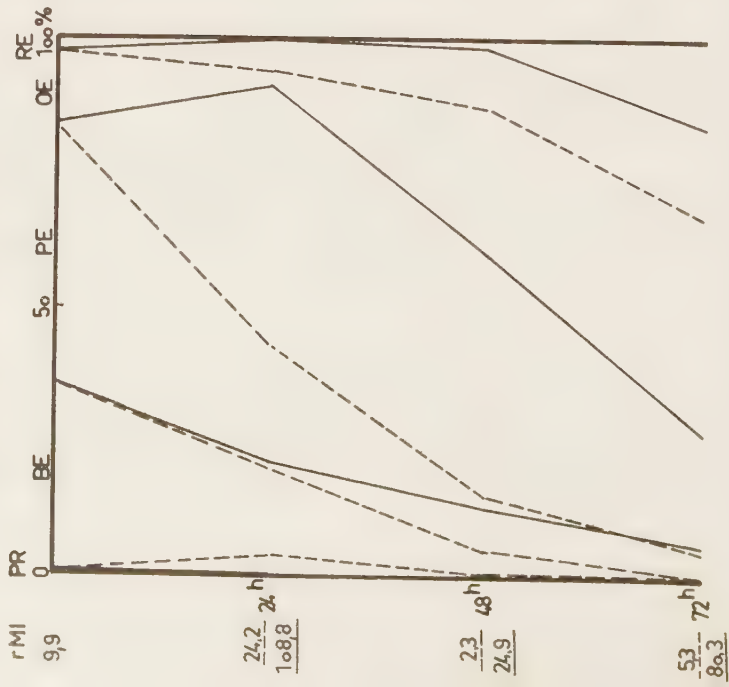
Die Anzahl der beobachteten Mitosen sinkt nach VCR-Gabe in der Granulopoese. In der Erythropoese verursacht das VCR eine bedeutende Zunahme der Mitosen. Die Verteilung der Mitosephasen ist aus den folgenden Tabellen zu entnehmen.

# VERSUCH 6

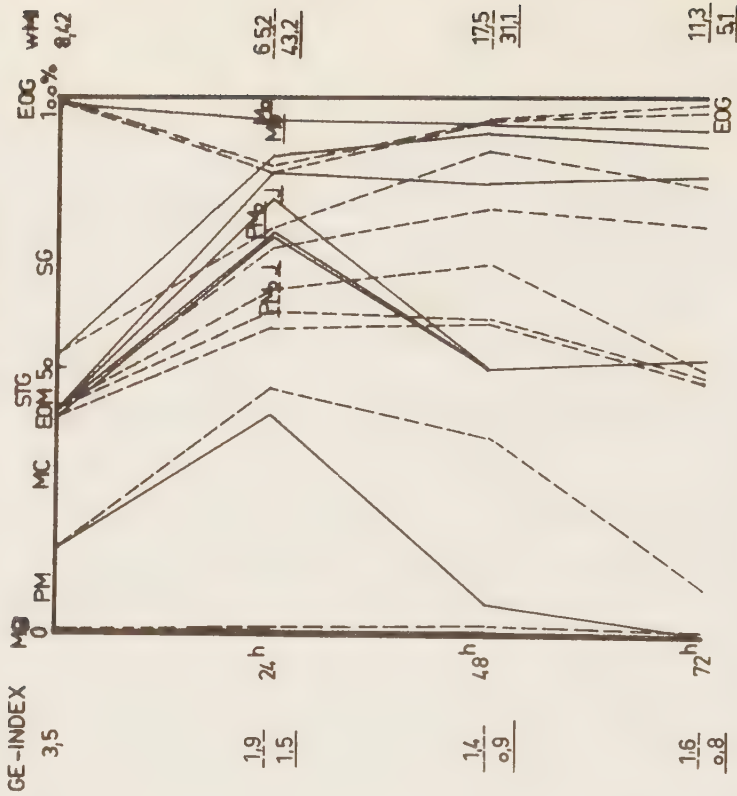
VCR 0,5 µg/ml

ABB. 6

## ERYTHROPOESE



## GRANULOPOESE



- 32a -

Zahl der Mitosen

|           | Granulopoese | Erythropoese |
|-----------|--------------|--------------|
| Kontrolle | 49           | 13           |
| VCR       | 31           | 99           |

Verteilung der Mitosephasen (%)

|              | P  |     | fM |     | sM |     | A  |     | T |     | R |     |
|--------------|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|---|-----|---|-----|
|              | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K | VCR | K | VCR |
| Granulopoese | 47 | 23  | 24 | 3   | 24 | 74  | 4  | 0   | 0 | 0   | 0 | 0   |
| Erythropoese | 31 | 59  | 23 | 7   | 23 | 34  | 15 | 0   | 8 | 0   | 0 | 0   |

Im Originalausstrich des Knochenmarks fällt wieder eine rechts verschobene Granulocytopoese auf. Die normal vorhandene Erythropoese ist in der Zellverteilung und Morphologie unverändert. Der G/E-Index beträgt 3,5.

Reifung der Granulopoese: Im Kontrollpräparat fällt eine Zunahme der Promyelocyten nach 24 Stunden Bebrütung auf. Die Myelocyten und Segmentkernigen nehmen sichtbar ab. Es werden Promonocyten und Monocyten sowie jugendliche Granulocyten beobachtet. Nach 48 h wird eine mäßige Ausreifung der Promyelocyten zu Myelocyten sichtbar. Der Promonocyten-Anteil nimmt leicht zu. Die jugendlichen Granulocyten bleiben annähernd konstant. Die stabkernigen Granulocyten nehmen zu. Im Verhältnis dazu nehmen die segmentkernigen Granulocyten ab. Auch die Monocyten vermindern sich zu dem Zeitpunkt. Nach 72h wird eine weitere Ausreifung der Promyelocyten deutlich. Die Myelocyten nehmen zu und sind jetzt etwas stärker vertreten als im Originalausstrich. Promonocyten werden kaum noch beobachtet. Jugendliche Granulocyten sind am 3. Bebrütungstag zahlreich vorhanden. Stabkernige Zellen sind rückläufig, segmentkernige Zellen nehmen dagegen leicht zu. Es werden nur noch wenig Monocyten beobachtet.

Durch den Einfluß von 0,5 µg/ml VCR nach 24 h ist zunächst eine geringe Verminderung der Promyelocyten und eine deutliche Zunahme der Myelocyten sichtbar. Stabkernige und segmentkernige Zellen kommen nach VCR-Zugabe weniger als im vergleichbaren Kontrollpräparat vor. Promonocyten sind leicht vermehrt, Monocyten sind hingegen zurückgegangen. Nach 48 h nimmt der Myelocyten-Anteil abermals zu, während die Promyelocyten stark vermindert sind. Gleichzeitig werden vermehrt jugendliche Granulocyten beobachtet. Stabkernige sind unverändert, segmentkernige Zellen haben anteilmäßig abgenommen. Monocyten sind ebenso stark wie in der Kontrolle vertreten. Nach 72 h sind Promyelocyten verschwunden, Myelocyten sind dagegen stark vermehrt. Jugendliche haben zugenommen, während stab- und segmentkernige Zellen insgesamt vermindert beobachtet werden. Eine Ausreifung in der Granulopoese liegt vor.

Reifung der Erythropoese: Nach 24 h findet sich eine deutliche Vermehrung der oxyphilen Erythroblasten. Der Anteil der reifen Erythroblasten verdoppelt sich. Dafür gehen die basophilen und polychromatischen anzahlmäßig stark zurück. Die Proerythroblasten nehmen etwas zu. Die Tendenz der Ausreifung hält auch nach 48 h Bebrütung an. Dadurch wird der Anteil der unreifzelligen Blasten abermals geringer. Nach 72 h Bebrütung finden sich im Kontrollpräparat hauptsächlich oxyphile und reife Erythroblasten. Die polychromatischen Erythroblasten sind anteilmäßig auf unter 5 % zurückgegangen. Basophile Erythroblasten sind kaum noch zu beobachten.

Durch die Einwirkung von 0,5 µg/ml VCR wird der polychromatische Erythroblasten-Anteil nach 24 h vermehrt, der basophile Erythroblasten-Anteil nimmt gering zu. Zu dem Zeitpunkt finden sich nur wenig oxyphile und keine reifen Erythroblasten im Ausstrich. Mit fortschreitender Kulturdauer kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme der reifen Zellformen. Nach 48 h Bebrütung bleibt der erhöhte Anteil der basophilen und polychromatischen Erythroblasten im Vergleich zur Kontrolle bestehen. Ein geringer Anteil von reifen Erythroblasten und etwa nur die Hälfte der im Kontrollpräparat

beobachteten oxyphilen Erythroblasten sind nach VCR-Zusatz vorhanden. Nach 72 h ist der Anteil der reifen Erythroblasten im Vergleich zum Kontrollpräparat um ca. die Hälfte reduziert. Der Anteil der oxyphilen Erythroblasten ist gering. Die polychromatischen Erythroblasten sind anteilmäßig vermehrt.

#### Versuchsreihe IV

##### Versuch 7 (Abb.7)

Die Knochenmarkproben des Versuchs 7 wurden mit 3,3 µg/ml VCR inkubiert. Die letzte Untersuchungsreihe wurde mit dem Sternalpunktat der 74-jährigen Patientin G.A. durchgeführt, die mit Verdacht auf Leukämie überwiesen wurde.

Diagnose: unklar, eventuell eine beginnende chronisch myeloische Leukämie. Während weiterer 2-jähriger Beobachtung der Patientin war keine Leukämie feststellbar.

Blutbild (3.12.1969) zum Zeitpunkt der Sternalpunktion:

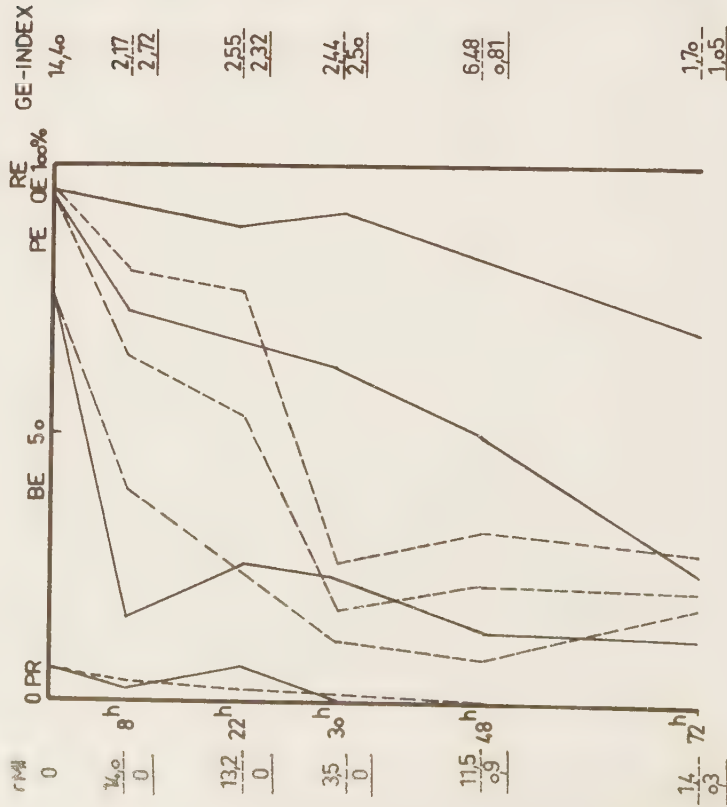
|                 |              |                |                |
|-----------------|--------------|----------------|----------------|
| Erythrocyten:   | 4,33 Mill/µl | Leukocyten:    | 15200/µl       |
| Hb              | 13,5 g%      | Eosinophile    | 1 relativ (%)  |
| Hb <sub>E</sub> | 30,8 pg      | Stabkernige    | 11 relativ (%) |
|                 |              | Segmentkernige | 75 relativ (%) |
|                 |              | Monocyten      | 2 relativ (%)  |
| Thrombocyten    | 280000/µl    | Lymphocyten    | 11 relativ (%) |

In der letzten Versuchsreihe ergeben sich folgende Mitose-Indices:

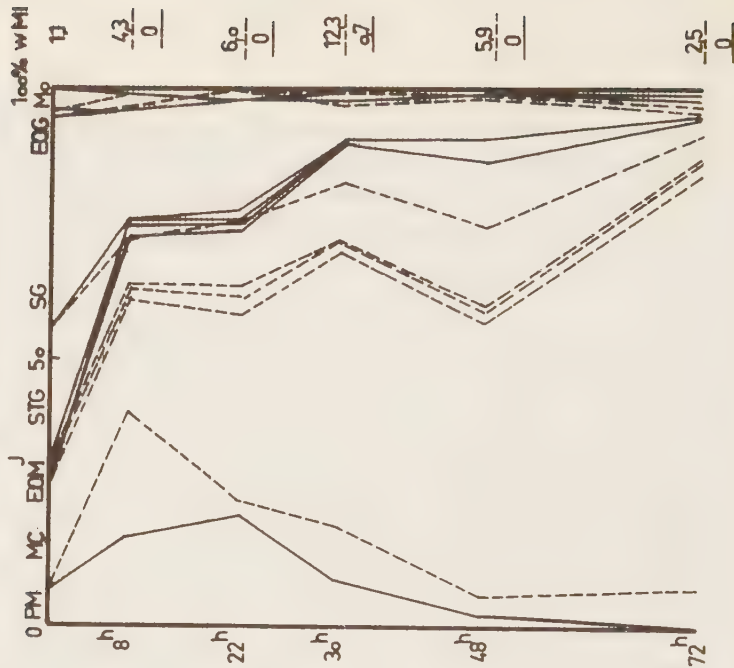
weißer Mitose-Index:

|                     | 0   |     | 8 h |      | 22 h |      | 30 h |      | 48 h |     | 72 h |     |
|---------------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-----|------|-----|
|                     | K   | VCR | K   | VCR  | K    | VCR  | K    | VCR  | K    | VCR | K    | VCR |
|                     | 1,1 | 4,3 | 0   | 6,0  | 0    | 12,3 | 0,7  | 5,9  | 0    | 2,5 | 0    |     |
| roter Mitose-Index: |     |     |     |      |      |      |      |      |      |     |      |     |
|                     | 0   | 13  | 0   | 13,2 | 0    | 3,5  | 0    | 11,9 | 0,9  | 1,4 | 0,3  |     |

# ERYTHROPOESE



# GRANULOPOESE



Die Zahl der Mitosen geht nach VCR-Gabe erheblich zurück. Die Verteilung der Mitosephasen ist aus den Tabellen ersichtlich:

Zahl der Mitosen

|           | Granulopoese | Erythropoese |
|-----------|--------------|--------------|
| Kontrolle | 44           | 23           |
| VCR       | 3            | 3            |

Verteilung der Mitosephasen (%)

|              | P |     | fM |     | sM |     | A  |     | T  |     | R |     |
|--------------|---|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|---|-----|
|              | K | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K  | VCR | K | VCR |
| Granulopoese | 9 | 33  | 2  | 33  | 63 | 44  | 14 | 0   | 11 | 0   | 0 | 0   |
| Erythropoese | 4 | 0   | 4  | 0   | 57 | 100 | 12 | 0   | 13 | 0   | 0 | 0   |

Von diesem Knochenmark wurden Kontrollpräparate sowie Testpräparate mit der höchsten Dosis (3,3 µg/ml VCR) nach 8, 22, 30, 48 und 72 Stunden angefertigt, um einen möglicherweise schon nach 24 h wieder verschwundenen Effekt auf den Mitoseindex zu erfassen. Im Originalausstrich des Knochenmarkpräparats fällt in der vermehrten Granulopoese eine Rechtsverschiebung auf. Die verminderte Erythropoese ist dagegen linksverschoben. Der G/E-Index beträgt 14,40.

Reifung der Granulopoese in vitro: Im Kontrollpräparat fällt nach 8-stündiger Bebrütung eine Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten auf, die reifen Granulocyten nehmen dafür ab. Nach 22 Stunden Bebrütung vermehren sich die Myelocyten, die unreifen Blasten nehmen anteilmäßig ab, während die Granulocyten sich kaum verändern. Diese Tendenz hält bis zu 30-stündiger Bebrütung an. Am 2. Kulturtage fällt eine Verminderung der Myelocyten auf. Auch die Promyelocyten nehmen weiter zu diesem Zeitpunkt ab. Während sich der stabkernige Anteil kaum ändert, nehmen die segmentkernigen Granulocyten

zu. Nach 72 Stunden finden sich neben einigen wenigen Promyelocyten und Granulocyten hauptsächlich Myelocyten.

Nach Zugabe von 3,3 µg/ml Testsubstanz VCR zu den Knochenmarkkulturen wird zeitabhängig eine mehr oder weniger starke Abnahme der Promyelocyten und der Granulocyten beobachtet. Die Abnahme dieser Zellen geht einher mit einer kontinuierlichen Zunahme der Myelocyten.

Reifung der Erythropoese in vitro: Im 8-Stunden Ausstrich der Kontrollversuchsreihe wird eine normale Reifung sichtbar, die auch noch nach 22 und 30 Stunden anhält. Die Zellverteilung ändert sich nach 48-stündiger Bebrütung nicht mehr entscheidend: Die basophilen und reifen Erythroblasten nehmen leicht ab, die polychromatischen Zellen leicht zu, während die oxyphilen Erythroblasten in etwa konstant bleiben. Die Zellverteilung bleibt nach drei Bebrütungstagen bei den oxyphilen und reifen Erythroblasten unverändert. Während sich die basophilen vermehren, verringern sich relativ dazu die polychromatischen Erythroblasten.

Durch die hohe Vincristingabe stellt sich nach 8 Stunden Einwirkung eine Reifungsbeschleunigung der Proerythroblasten und besonders der basophilen Erythroblasten ein. Bei den ausgereiften Zellen ist eine Reifungsverzögerung gegenüber dem Kontrollbefund zu verzeichnen. Sichtbar zugenommen haben die polychromatischen Erythroblasten, während die oxyphilen Erythroblasten anteilmäßig gleich geblieben sind. Nach 22-stündiger Bebrütung ist eine Zunahme der Proerythroblasten und der polychromatischen Erythroblasten auffällig. Die reifen Erythroblasten sind stark vermindert, während die basophilen Erythroblasten annähernd konstant geblieben sind. Nach 30 Stunden Einwirkungszeit von VCR zeichnet sich eine Vermehrung der unreifen Vorstufen in der Erythropoese bis hin zu den oxyphilen Erythroblasten ab. Die reifen Erythroblasten sind stark vermindert. Proerythroblasten werden nicht beobachtet: Nach 48 Stunden hält die Ausreifungshemmung immer noch an. Oxyphile, polychromatische und

basophile Erythroblasten sind im Gegensatz zum Kontrollpräparat vermehrt. Im 72-Stunden Ausstrich ist der Anteil der reifen Erythroblasten gering. Ebenso sind die basophilen Erythroblasten zurückgegangen. Dafür haben die reifen Vorstufen, die polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten zugenommen.

D. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE AUS DEN MITOSE-INDICES, DEN KARYOLOGISCHEN KURVEN, DEN REIFUNGSKURVEN UND DEM G/E-INDEX

1. Mitose-Indices (Tabelle 1 und 2)

Die Berechnungen der Mitose-Indices der Granulopoese zeigen, daß bei einer minimalen Dosierung von 0,00005 µg/ml VCR (Versuch 1,2,3) zu allen Zeitpunkten die Mitose-Indices herabgesetzt sind. Eine Ausnahme bildet Versuch 3, bei dem ein Anstieg nach 24 h zu verzeichnen ist.

Bei einer mittleren Dosierung von 0,05 µg/ml (Versuch 4 und 5) bewirkt das VCR nach 24 h einen enormen Anstieg des Mitose-Index, der anschließend wieder absinkt.

Bei Versuch 6 wird nach 0,5 µg/ml VCR-Zusatz der Mitose-Indexanstieg erst am 2. Bebrütungstag sichtbar und fällt anschließend wieder ab.

Versuch 7, der mit der höchsten Testsubstanzdosis (3,3 µg/ml VCR) inkubiert wurde, weist fast ein totales Fehlen von Mitosen nach VCR-Gabe auf.

In der Erythropoese bewirken 0,00005 µg/ml VCR-Einwirkung in den Versuchen 1 und 2 nach 24 h, im Versuch 3 nach 48 h einmalig eine Mitosevermehrung.

Nach 0,05 µg/ml VCR-Gabe kommt es in den Versuchen 4 und 5 am 1. Versuchstag zu einem bedeutenden Anstieg der Mitose-indices, der noch nach 48 h sichtbar ist. Nach 72 h sinkt er auf 0 ab.

0,5 µg/ml VCR-Testsubstanz (Versuch 6) bewirkt an den drei Bebrütungstagen einen deutlichen Mitose-Indexanstieg.

Die maximal angewandte Dosis von 3,3 µg/ml VCR (Versuch 7) löst an allen Stichtagen eine Abnahme der Mitoseindices aus. Bei den ersten Zusatzkulturen bis einschließlich des 30-Stunden-Wertes ist sogar ein totales Fehlen von Mitosen zu verzeichnen.

Tabelle 1: Weißer Mitose-Index

| Ver-<br>such | Konzentr.<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0 h<br>K | 8 h<br>K VCR | 22 h<br>K VCR | 24 h<br>K VCR | 30 h<br>K VCR | 48 h<br>K VCR | 72 h<br>K VCR | 96 h<br>K VCR |
|--------------|-----------------------------------|----------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1            | 0,00005                           | 16,3     | -            | -             | 1,0 2,3       | -             | 1,5 0         | 0 3,2         | -             |
| 2            | 0,00005                           | 12,1     | -            | -             | 6,7 1,7       | -             | 13,2 0        | 0 0           | -             |
| 3            | 0,00005                           | 19,1     | -            | -             | 3,7 12,7      | -             | 0 2,3         | 12,1 0        | 0             |
| 4            | 0,05                              | 13,1     | -            | -             | 39,2 82,7     | -             | 33,2 0        | 0 0           | -             |
| 5            | 0,05                              | 0        | -            | -             | 45,6 77,6     | -             | 20,8 19,6     | 36,5 0        | -             |
| 6            | 0,5                               | 8,4      | -            | -             | 65,2 43,2     | -             | 17,5 31,1     | 11,3 5,1      | -             |
| 7            | 3,3                               | 1,1      | 4,3 0        | 6,0 0         | -             | 12,3 0,7      | 5,9 0         | 2,5 0         | -             |

Tabelle 2: Roter Mitose-Index

|   |         |      |        |        |            |       |           |          |   |
|---|---------|------|--------|--------|------------|-------|-----------|----------|---|
| 1 | 0,00005 | 22,7 | -      | -      | 0 41,6     | -     | 5,1 0     | 5,8 0    | - |
| 2 | 0,00005 | 24,0 | -      | -      | 0 16,6     | -     | 3,2 0     | 0 0      | - |
| 3 | 0,00005 | 0    | -      | -      | 9,5 0      | -     | 10,7 17,6 | 0 0      | 0 |
| 4 | 0,05    | 0    | -      | -      | 2,6 38,8   | -     | 0 4,0     | 0 0      | - |
| 5 | 0,05    | 0    | -      | -      | 7,0 29,8   | -     | 0 15,1    | 0 0      | - |
| 6 | 0,5     | 9,9  | -      | -      | 24,2 108,8 | -     | 2,3 24,9  | 5,3 80,3 | - |
| 7 | 3,3     | 0    | 14,0 0 | 13,2 0 | -          | 3,5 0 | 11,5 0,9  | 1,4 0,3  | - |

K = Kontrolle; VCR = Vincristin-Zusatz

## 2. Karyologische Kurven (Abb.8)

Die karyologischen Kurven zeigen in zwei graphisch getrennten Darstellungen die Verteilung der verschiedenen Mitosephasen für die Erythropoese und die Granulopoese. Es wurden jeweils sämtliche Mitosen der Kontrollkulturen und der Zusatzkulturen zusammengefaßt und miteinander verglichen.

In der Erythropoese werden deutliche Abweichungen der Mitosephasenverteilung bei den Zusatzkulturen sichtbar. Im Gegensatz zu den Kontrollwerten finden sich unter VCR-Einfluß vermehrt Prophasen und späte Metaphasen. Frühe Metaphasen sowie Anaphasen liegen unter den vergleichbaren Kontrollwerten. Telophasen und Rekonstruktionsphasen werden nach VCR-Gabe zu keinem Zeitpunkt gefunden.

In der Granulopoese werden bei den Zusatzkulturen am häufigsten späte Metaphasen beobachtet. Die übrigen Mitosephasen liegen alle unter den vergleichbaren Kontrollkulturwerten.

Tabelle 3: weiße Reihe

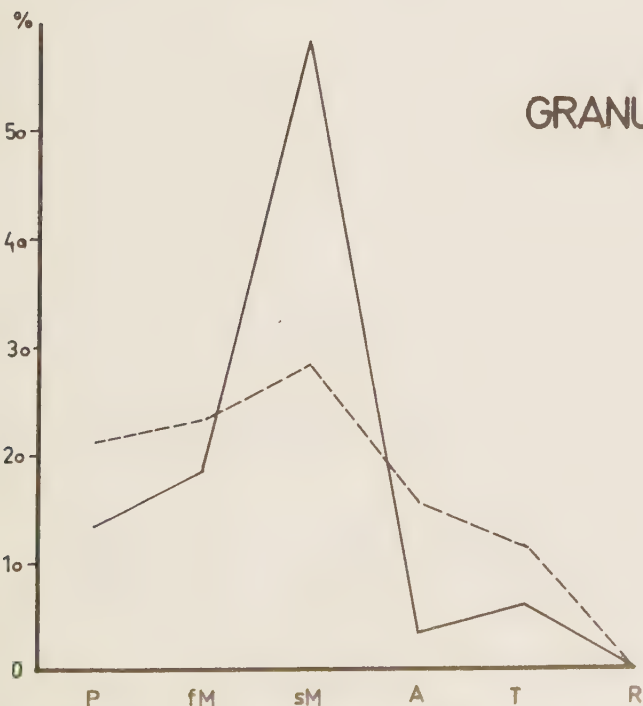
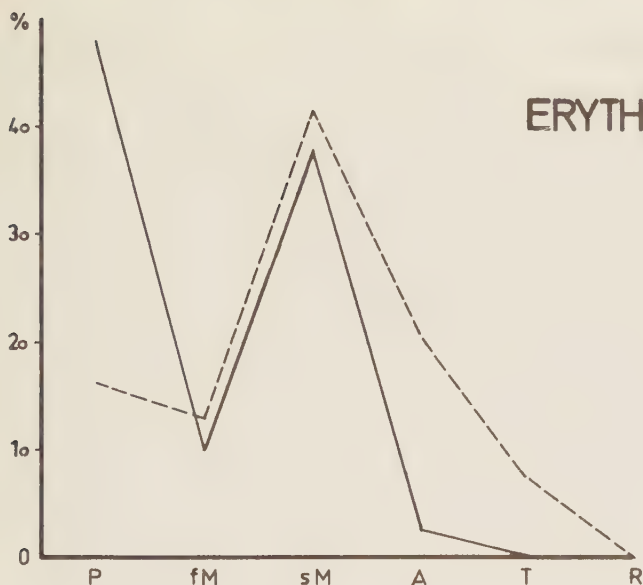
| Konzentration<br>(µg/ml) | P  |   | fM |    | sM |    | A  |   | T |   | R |   |
|--------------------------|----|---|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|
|                          | K  | V | K  | V  | K  | V  | K  | V | K | V | K | V |
| 0,00005                  | 12 | 3 | 9  | 7  | 27 | 5  | 14 | 2 | 5 | - | - | - |
| 0,05                     | 11 | - | 13 | 10 | 5  | 15 | 5  | - | - | - | - | - |
| 0,5                      | 23 | 7 | 12 | 1  | 12 | 23 | 2  | - | - | - | - | - |
| 3,3                      | 4  | 1 | 1  | 1  | 28 | -  | 6  | 1 | 5 | - | - | - |

Tabelle 4: rote Reihe

| Konzentration<br>(µg/ml) | P |    | fM |    | sM |    | A |   | T |   | R |   |
|--------------------------|---|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|---|
|                          | K | V  | K  | V  | K  | V  | K | V | K | V | K | V |
| 0,00005                  | 3 | 3  | 8  | 5  | 4  | 7  | 5 | 3 | 4 | 3 | - | - |
| 0,05                     | - | -  | 2  | 19 | 1  | 46 | 4 | 4 | - | 1 | - | - |
| 0,5                      | 4 | 58 | 3  | 7  | 3  | 34 | 2 | - | 1 | - | - | - |
| 3,3                      | 1 | -  | 1  | -  | 13 | 3  | 5 | - | 3 | - | - | - |

# VERTEILUNG DER MITOSEPHASEN

ABB.8



— VINCRISTIN  
 ---- KONTROLLE

ERYTHROPOESE : 154  
 ERYTHROPOESE : 67

GRANULOPOESE : 81  
 GRANULOPOESE : 196

### 3. Reifungskurven

#### Granulopoese

In den Versuchen 1,2,3 wurde die Konzentration von 0,00005 µg/ml VCR angewandt. Im Versuch 1 findet sich keine durch VCR verursachte charakteristische Abweichung. Auffällig ist, daß im Kontrollversuch der Promonocytenleukämie einmalig Myeloblasten nach 24 h Bebrütung auftauchen. Myeloblasten treten dagegen in den Testkulturen zu keiner Zeit auf. Ob es sich hier um Monoblasten handelt, was naheliegender ist, muß unentschieden bleiben, da wir keine  $\alpha$ -NA-Esterasefärbung in vitro durchgeführt hatten. Im weiteren Kurvenverlauf zeigen sich im Versuch 1 nach 48 und 72 h Bebrütung nur geringe Abweichungen vom Kontrollpräparat. Versuch 2 weist nach VCR-Einwirkung an allen drei Bebrütungstagen eine vermehrte Ausreifung auf. Im Versuch 3 ist am 1. und 2. Bebrütungstag eine verzögerte Ausreifung erkennbar. Nach 72 h Bebrütung nähern sich die Werte der Zusatzkultur den Werten der Kontrollkultur.

In den Versuchen 4 und 5 wurde das Knochenmark mit 0,05 µg/ml VCR inkubiert. Am 1. Inkubationstag weisen beide Versuche eine beschleunigte Reifungstendenz auf. Am zweiten Bebrütungstag hält die Tendenz beim 4. Versuch an, während bei Versuch 5 das VCR wachstumshemmend wirkt. Am 3. Tag ist bei beiden Versuchsserien eine wachstumshemmende Reaktion festzustellen.

Im Versuch 6 verursachen 0,5 µg/ml VCR-Zugabe nach dem 1.Tag eine Reifungshemmung der Myelocyten. Nach 48 h kommt es zur Ausreifung, die in der Zunahme der jugendlichen Granulocyten deutlich wird. Die Zellverteilung ändert sich am 3. Kulturtag kaum. Eine Ausreifung durch VCR hat nicht stattgefunden.

3,3 µg/ml VCR-Zusatz lösen im Versuch 7 zu allen Testzeiten eine Reifungshemmung der Myelocyten aus, die mehr oder weniger stark ausgeprägt ist.

## Erythropoese

In unseren Kontrollkulturen findet sich die nach BOLL (4) erwartete fortschreitende Zunahme reifer Zellen unter Abnahme teilungsfähiger Zellen. Ausnahme bildet der Versuch 1, der eine deutliche Zunahme der polychromatischen Erythroblasten aufweist. VCR wirkt in einer Konzentration von  $0,00005 \mu\text{g/ml}$  an allen Bebrütungstagen auf das Knochenmark des Versuchs 2 reifungshemmend. Die Knochenmarkproben 1 und 3 entziehen sich nach 24 h Bebrütung einer vergleichenden Aussage, weil zu wenig differenzierbare Erythroblasten im Kontroll- bzw. im Testpräparat gefunden wurden. Am 2. Bebrütungstag weist auch Versuch 1 Reifungshemmung auf, während zu diesem Zeitpunkt die Reifung bei Versuch 3 beschleunigt ist. Nach 72 h hält die Reifungshemmung bei Versuch 1 ebenso wie bei Versuch 3 an.

Die Ausreifung der Erythropoese wurde bis auf die Ausnahme bei Versuch 3 (48 h) durch  $0,00005 \mu\text{g/ml}$  VCR verzögert.

$0,05 \mu\text{g/ml}$  VCR-Zusatz bewirken nach 24 h Inkubation auf das Knochenmark der Versuche 4 und 5 eine Reifungshemmung. Nach 48 h wird eine Tendenz zur vermehrten Ausreifung sichtbar, die auch nach 72 h anhält. Die Kontrollwerte werden jedoch nicht erreicht.

Auch  $0,5 \mu\text{g/ml}$  VCR hat auf das Knochenmark (Versuch 6) nach 24 h einen reifungshemmenden Effekt. Ebenso wie bei  $0,05 \mu\text{g/ml}$  VCR Zusatz ist eine Tendenz zur vermehrten Ausreifung nach dem 2. und 3. Bebrütungstag erkennbar. Die Zusatzwerte liegen jedoch auch hier unter den vergleichbaren Kontrollwerten.

$3,3 \mu\text{g/ml}$  VCR Einfluß verursacht zu allen Zeitpunkten eine Reifungshemmung.

#### 4. G/E-Index (Tabelle 5)

Sowohl in den Originalausstrichen als auch den Kulturen zeigen die Zellverhältnisse der weißen zur roten Reihe schwankende Werte.

Innerhalb der Versuchsreihe I, bei der 0,00005 µg/ml VCR verwendet wurde, ist ein Absinken des G/E-Index zu verzeichnen. Ausnahme bildet Versuch 1 nach 72 h sowie Versuch 3 nach 24 h, 48 h und 72 h.

In den Versuchen 4 und 5 bewirkten 0,05 µg/ml VCR bis auf eine geringe Abweichung (Versuch 4 nach 24 h) ein Absinken des G/E-Index.

In der Versuchsserie 6, bei der 0,5 µg/ml VCR inkubiert wurde, löst die Substanz zu allen Stichpunkten ein Absinken des G/E-Index aus.

Im Versuch 7 wurde mit 3,3 µg/ml VCR gearbeitet. Nur nach 8 h und 30 h wird ein geringer G/E-Index-Anstieg sichtbar, zu allen übrigen gemessenen Zeiten sinken die G/E-Indices ab.

Zusammenfassend läßt sich ableiten, daß die verschiedenen VCR-Konzentrationen unserer Versuchsreihen eine quantitative Vermehrung der Erythroblasten in dem Knochenmark verursacht haben: Die Grundtendenz weist nach VCR-Gabe einen sinkenden G/E-Index auf.

Tabelle 5: G/E-Index

| Ver-<br>such | Konzentr.<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0 h   | 8 h | 22 h      | 24 h  | 30 h      | 48 h      | 72 h      | 96 h |
|--------------|-----------------------------------|-------|-----|-----------|-------|-----------|-----------|-----------|------|
|              |                                   | K     | K   | K         | K     | K         | K         | K         | K    |
|              |                                   | V     | V   | V         | V     | V         | V         | V         | V    |
| 1            | 0,00005                           | 20,95 | -   | -         | 71,07 | 9,20      | 3,50      | 4,49      | -    |
| 2            | 0,00005                           | 4,9   | -   | -         | 1,51  | 1,33      | 1,70      | 1,64      | -    |
| 3            | 0,00005                           | 20,9  | -   | -         | 1,01  | 117,25    | 0,26      | 0,13      | -    |
| 4            | 0,05                              | 1,4   | -   | -         | 0,2   | 0,3       | 0,6       | 0,6       | 0,74 |
| 5            | 0,05                              | 5,84  | -   | -         | 0,74  | 0,04      | 0,99      | 0,61      | -    |
| 6            | 0,5                               | 3,51  | -   | -         | 1,9   | 1,5       | 1,4       | 0,8       | -    |
| 7            | 3,5                               | 14,4  | -   | 2,17 2,72 | -     | 2,44 2,50 | 6,48 0,81 | 1,70 1,05 | -    |

K = Kontrolle; V = Vincristin-Zusatz

## E. DISKUSSION

Das Knochenmark ist ein Gewebe mit höchster Proliferationsaktivität. Daher ist es zulässig, schon nach kurzen Einwirkzeiten zu testender Substanzen Rückschlüsse auf eine Änderung derselben zu ziehen. Aussagen über die Proliferationsaktivität des Knochenmarks in vitro liefern die Mitoseindices sowie die Reifungskurven.

Mit vier verschiedenen Dosen und unterschiedlich langen Einwirkzeiten werden die Einflüsse des Vincristin-Sulfats auf Wachstum und Teilung der Knochenmarkszellen von sieben Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen (3 leukämischen, 2 carzinogenen, 1 Morbus Hodgkin sowie einer unspezifischen Markprobe) in vitro untersucht. Die verschiedenen Versuche sollen miteinander verglichen werden.

Aus der eingangs erwähnten Literatur geht hervor, daß das VCR ein Spindelgift ist und in der Metaphase angreift.

GEORGE et al. (19) bewiesen diese Annahme durch kinemographische Phasenkontrastaufnahmen an He-La-Zellen: Auch unter hohen VCR-Dosen traten keinerlei Störungen der Prophase ein. Alle Metaphasefiguren wurden vor ihrer Vollendung gestoppt.

Nach Angaben von CUTTS (15) ist zu erwarten, daß die Zahl der arretierten Mitosen nach einmaliger Dosierung keinerlei Abhängigkeit von der Höhe der Dosis erkennen läßt. Sie sind vielmehr abhängig von der Teilungsaktivität der Zellen. Diese Resultate lassen sich nicht mit unseren Ergebnissen in Einklang bringen.

Bei der Wahl der Konzentrationen für unsere Versuchsreihen haben wir uns orientiert:

1. An in vitro Untersuchungen mit Vinblastin von SIEBS (40), VALERIOTE und BRUCE (48). Das Vincristin unterscheidet sich vom Vinblastin in der chemischen Struktur nur durch eine N-Formylgruppe statt einer N-Methylgruppe am Dihydroindol. Beide Stoffe werden von CARDINALI (9,10)

ähnlich bewertet. Mit Vinblastin beobachtet SIEBS in einer morphologischen Untersuchungsreihe in menschlichen Tumoren charakteristische Störungen im Mitoseablauf. Als Wirkungsgrenzdosis des Vinblastin gab sie für Tumorkulturen (Cervix Carcinom, Larynx Carcinom, Sarkom) 0,0017 µg/ml an. Bei einem in vitro-Tierversuch mit Mäusen von VALERIOTE und BRUCE wiesen die L-Zellen bei Vinblastinkonzentrationen von 0,001 µg/ml noch wachstumshemmende Wirkung auf.

WILMS (49), der in vivo-Untersuchungen an Patienten mit akuten Leukämien mit VCR durchführte, um die Sensibilität der leukämischen Zellpopulationen gegenüber VCR zu beurteilen, kam mit Konzentrationen von 0,082 µg/ml zu positiven Ergebnissen. Wir wählten für drei unserer Untersuchungsreihen eine noch geringere Dosis VCR in Höhe von 0,00005 µg/ml, um festzustellen, ob selbst mit dieser geringen Dosis noch ein positiver Effekt auszulösen sei. In unseren Untersuchungen trat eine negative Reaktion ein. Eine Verminderung der Mitoseaktivität wurde nach Gabe von 0,00005 µg/ml VCR sichtbar.

2. Bei der Wahl der Konzentrationen für unsere nächste Untersuchungsreihe sind wir von in vivo Untersuchungen von MARMONT und DAMASIO (33) ausgegangen, die den Effekt von VCR auf das Knochenmark von an Lymphosarkomen und an akuter Leukämie erkrankten Patienten untersucht haben. MARMONT und DAMASIO fanden in Lymphknotenpunktaten und Knochenmarkpunktaten von Patienten mit malignen Lymphomen und akuten Leukämien unter der Therapie mit VCR in Höhe von 0,05 - 0,10 mg/kg eine quantitative Korrelation zwischen dem Ausmaß der blockierten Mitosen und der Regression des Tumors. Auch in unserer Untersuchungsreihe, bei der wir mit 0,05 µg/kg VCR arbeiteten, kommt es zum deutlichen Anstieg blockierter Mitosen nach 24 h in der Granulo- und Erythropoese. In der Erythropoese ist der Anstieg noch nach dem 2. Bebrütungstag sichtbar.

3. Sind wir ausgegangen von Untersuchungen von CARDINALI (11), der in Tierversuchen mit Mäusen die Zellteilung des Knochenmarks nach VCR-Gabe prüfte. CARDINALI untersuchte die Zellverteilung nach Gabe von 0,05 - 0,5  $\mu\text{g/ml}$  VCR an normalem und leukämischem Knochenmark von Mäusen. Die Anhäufung arretierter Metaphasen im normalen und leukämischen Mäuseknochenmark folgte einem Muster, welches nach Colchicin und Vinblastin-Behandlung beobachtet wird. In unserer Serie, bei der 0,5  $\mu\text{g/ml}$  VCR inkubiert wurde, werden in der Erythropoese zu allen Zeiten vermehrt Mitosen beobachtet, im Gegensatz zur Granulopoese, wo ein Mitoseanstieg nur am 2. Bebrütungstag sichtbar ist.
4. Orientierten wir uns an Ergebnissen der in vitro Versuche von GEBHART et al. (19). GEBHART hatte Chromosomenuntersuchungen nach VCR-Gabe mit Konzentrationen von 1,25 - 5  $\mu\text{g/ml}$  durchgeführt. Bei allen seinen Untersuchungen traten Chromosomenschäden auf. Dies berücksichtigend, wählten wir einen Mittelwert für eine Versuchsreihe von 3,3  $\mu\text{g/ml}$  VCR. Diese Dosis löste bei beiden Zellsystemen eine Reifungshemmung aus. Die Knochenmarkproben weisen ein fast totales Fehlen von Mitosen auf.

In unseren Untersuchungen tritt nur bei den mittleren Dosierungen die erwartete Erhöhung des Mitoseindex sowohl in der Granulopoese als auch in der Erythropoese auf. Hierbei fällt auf, daß der Mitoseanstieg, abhängig von der Dosishöhe, einmal

- a) bei 0,05  $\mu\text{g/ml}$  VCR nach 24 h sowohl in der Granulopoese als auch in der Erythropoese eintritt.
- b) Bei der höher gewählten Dosis von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  VCR wird der Mitoseanstieg in der Granulopoese erst nach 48 h sichtbar, in der Erythropoese tritt er bereits nach 24 h ein. Auch in den folgenden beiden Tagen liegt er über den Kontrollwerten.

- c) Bei der höchsten Dosis ( $3,3 \mu\text{g/ml}$ ) VCR, die in den Versuchsreihen verwendet wurde, fällt ein fast totales Verschwinden von Mitosen im Vergleich zu den Versuchsreihen auf, bei denen die geringste Dosis Testsubstanz zugegeben wurde. Diese geringen Dosen verursachen eine allgemeine Verminderung der Mitoseindices, die jedoch weniger ausgeprägt ist, als nach Gabe der hohen VCR-Dosis von  $3,3 \mu\text{g/ml}$ .

Die ausgebliebene Mitosevermehrung weist auf eine allgemeine Zelldestruktion hin. Es könnte sich auch um eine Rückwanderung der Mitoseform in Endomitosen handeln. So berichtet DUSTIN jr. (14), daß in tierischen Zellen ganz allgemein eine längere Hemmung der Spindelaktivität von umfangreichen zellulären Störungen gefolgt ist. Er schließt daraus, daß nicht der stathmokinetiche Effekt die therapeutische Wirkung auslöst, sondern der zelluläre Zusammenbruch, der aus einer überalterten Metaphase entsteht.

Daß die einmal in Gang gekommene Mitose fast immer eine Arretierung in der späten Metaphase erfährt, beweisen die karyologischen Kurven. Der Kurvenverlauf zeigt, daß trotz der stark erhöhten Mitoseindices eine Hemmung der Regenerationstätigkeit durch VCR in der späten Metaphase stattfindet. Die für ein Spindelgift nicht typischen Postmetaphasen, die in unseren Versuchen gegenüber den Kontrollwerten stark reduziert waren, beschreibt auch CARDINALI (11) in seinen Tierversuchen. Bei fortgeschrittener Versuchsdauer, erstmals 12 h nach Einwirkung von VCR, werden im Mäuseknochenmark vereinzelt Postmetaphasen beobachtet. Im Gegensatz zu CUTTS (13) fiel auf, daß die hohe Konzentration von  $3,3 \mu\text{g/ml}$  VCR bei Versuch 7 eine intensivere Zellzerstörung auslöste als die mittleren und Minimaldosen, die bei den übrigen Versuchen verwendet wurden. Nach Zugabe von  $0,00005 \mu\text{g/ml}$ ,  $0,05$  und  $0,5 \mu\text{g/ml}$  VCR waren die Zellen weitgehend unverändert, ab-

gesehen von vereinzelten Zellpyknosen und Zelltrümmern nach fortgeschrittener Bebrütungszeit. Inwieweit eine Zelldestruktion bei entsprechender Dosierung in vivo eintritt, ist abhängig von humoralen und nervalen Einflüssen des Organismus, der die Inaktivierung und Ausscheidung bestimmt. Das kann in unserer Versuchsreihe nicht geklärt werden.

In zwei Versuchsreihen (Versuch 1,2,3,7) wird in der leukämischen Granulopoese statt einer Spindelblockierung durch VCR der Effekt eines Radiomimetikums hervorgerufen. Die Reifung wird beeinflusst. In der Erythropoese verursachen 0,05, 0,5 und 3,3 µg/ml VCR zu allen Zeiten eine Reifungsverzögerung. Nach 0,00005 µg/ml VCR-Einfluss tritt in einem Versuch (3) am 2. Bebrütungstag eine deutlich vermehrte Ausreifung auf. Die übrigen Testserien weisen bei dieser Konzentration Reifungsverzögerung auf.

Bei Betrachtung der Proliferationskinetik der Erythropoese finden wir nach 24 h VCR-Einwirkung bei 0,05 und 0,5 µg/ml VCR eine deutliche Zunahme der polychromatischen Erythroblasten und somit eine Reifungshemmung dieser Zellart. Diese Hemmung geht in den folgenden beiden Tagen über in eine Reifungsbeschleunigung, wobei jedoch die vergleichbaren Kontrollwerte einen erheblich beschleunigten Ausreifungsgrad aufweisen.

In der Granulopoese ist eine eindeutige Aussage über die Zunahme der Ausreifung einer bestimmten Zellgruppe nicht feststellbar. Als Ursache müssen wir annehmen, daß unter dem VCR der G/E-Index soweit gesunken ist, daß bei starker Weiterdifferenzierung der Granulocyten, die Streubreite für unsere kleine Fallzahl zu groß ist, um eine klare Aussage treffen zu können.

Eine verzögerte Ausreifung der Granulopoese tritt nach 0,05 und 3,3 µg/ml VCR-Gabe ein. Eine vermehrte Ausreifung durch 0,5 µg/ml VCR-Einfluss hat nicht stattgefunden. In dieser Versuchsreihe wurde kein Mitoseblock nach VCR-Gabe beobachtet.

Innerhalb der Reifungskurven fällt der Versuch 1 aus dem Rahmen. Nachdem im Originalausstrich keine Myeloblasten beobachtet wurden, werden zur 24 Stunden-Bebrütung in den Kontrollen Myeloblasten oder Monoblasten sichtbar. Sie tauchen in keinen der übrigen Kontroll- sowie Testpräparaten wieder auf, so daß ein unterschiedliches Ausgangsmaterial als Klärung herangezogen werden muß. Das Auftreten der Myeloblasten in Form von Nestern ist bekannt.

Die Patientin mit der Myeloblastenleukämie (Versuch 3) war drei Tage vor der Sternalpunktion cytostatisch mit täglich 2 x 60 mg Cytosin-Arabinosid über sechs Tage behandelt worden. Möglicherweise waren hier therapeutisch cytostatische Einflüsse zum Zeitpunkt der Sternalpunktion noch wirksam und haben so das VCR-Testergebnis verfälscht. Dadurch erklärt sich vielleicht die ungewöhnliche Reifungshemmung in der Erythropoese.

Die beobachteten Veränderungen am Knochenmark sind bei den Fällen 1,2,3,7 nicht typisch für das Spindelgift VCR und entsprechen nicht den Erwartungen aus der Literatur. Das mag daran liegen:

1. Die Dosierung von 0,00005 µg/ml war ungeeignet, d.h. die Wirkungsschwelle wurde unterschritten, so daß kein für ein Spindelgift typischer Effekt sichtbar gemacht werden konnte. Eine ähnlich diffuse Reaktion wurde von MADOC-JONES (29) in einer Arbeit über Velbe und Vincristin beschrieben.
2. Die maximal angewandte Dosis von 3,3 µg/ml hatte zu Wachstums- und Teilungsstörungen geführt. Die Wirkungsschwelle wurde überschritten. Die charakteristische Metaphasevermehrung blieb aus.
3. Möglicherweise wurden ungünstige Zeitpunkte für die Versuchsreihe gewählt. CARDINALI (11) berichtet von Mäuseversuchen, daß bereits nach 6 Stunden VCR-Einwirkung ein maximaler Mitoseindex erreicht ist, der anschließend wieder geringer wird.

Es wäre empfehlenswert, bei weiteren Untersuchungen über VCR die Zeitpunkte für die Untersuchungen früher zu legen oder den gesamten Meßbereich zu erweitern, um nicht für die Substanz uncharakteristische Perioden zu überbewerten.

4. Es wurden Knochenmarksproben von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen untersucht. MARMONT (34) stellte fest, daß innerhalb der verschiedenen Leukämieformen unterschiedliche Sensibilität gegenüber dem VCR auftrat. In seinen in vivo Untersuchungen zeigte sich, daß bei sechs an akuten Lymphoblastenleukämie erkrankten Patienten nach VCR-Gabe im Mittel ein enormer Anstieg des MI von 7 auf ca. 95 % zu verzeichnen war. Bei 4 Myeloblastenleukämien war dagegen nur ein minimaler Anstieg des MI zu beobachten. Diese Beobachtung wird durch unsere Untersuchungsserie 2 bestätigt.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen weitgehend mit den erwähnten Untersuchungen anderer Autoren überein. Die auftretenden Abweichungen sind in der Tatsache begründet, daß die Dosierungen sich nicht unerheblich voneinander unterscheiden und somit bei den Knochenmarkproben die verschiedenen Reaktionsformen unter den gegebenen Umständen zu erklären sind.

Darüber hinaus lagen dem untersuchten Material verschiedene Grunderkrankungen zugrunde, so daß kein im ganzen gleichlaufendes Ergebnis zu erwarten war.

## F. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von Knochenmarkkulturen unter dem Einfluß von Vincristin-Sulfat (VCR) untersucht. Die Kulturserien wurden aus Knochenmarkpunk-taten von 7 Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen (4 verschiedene Formen von Leukämie, 2 Carcinome, 1 Morbus Hodgkin) hergestellt. Bei Anwendung von extrem niedriger ( $0,00005 \mu\text{g/ml}$ ) und hoher ( $3,3 \mu\text{g/ml}$ ) Konzentration löste das VCR eine Verminderung beziehungsweise totale Verhinderung der Mitoseaktivität aus. Bei einer Konzentra-tion von  $3,3 \mu\text{g/ml}$  VCR wurde ein fast totaler Mitoseblock beobachtet. Mittlere VCR-Dosierungen ( $0,05$  und  $0,5 \mu\text{g/ml}$ ) lösten in der Erythropoese und Granulopoese bei erheblicher Mitosearretierung eine eindeutige Reifungshemmung aus.

## VII. LITERATUR

1. Armstrong, J.G., Dyke, R.A. and Fouts, P.J.: Initial Clinical Experimence with Leucocristine, A New Alkaloid from *Vinca rosea* Linn, Proc. Am. A. Cancer Res., 3, 301 (1962)
2. Beer, C.T. and Richards, J.F.: The Metabolisme of Vinca Alkaloids. II. The Fate of tritiated Vinblastin in rats. Lloydia 27, 352 (1964)
3. Boll, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von KM-Zellen in vitro: 1. Granuloblastenmitosen. Folia haemat. 3, 78 (1958)
4. Boll. I.: Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Springer-Verlag, Heidelberg 1966
5. Boll, I., Mersch, G.: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulozytopoese in vitro. Blut XIX, 257 (1969)
6. Boll I. und Mersch, G.: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut XVII, 193 (1968)
7. Bohannan, R.A., Miller, D.G. and Diamond, H.D.: Vincristine in the Treatment of Lymphomans and Leukemias. Cancer Res. 23, 613 (1963)
8. Carbone, P.P., Bone, V., Frei, E. and Brindley, C.O.: Clinical Studies with Vincristine. Blood 21, 640 (1963)
9. Cardinali, Giuseppe and Cardinali, Guilina: Experimental Studies on the Combined Use of Vinblastine and Vincristine. Chemotherapie 12, 226 (1967)

10. Cardinali, G., Cardinali, G. and Centurelli, G.: The Catharantus roseus (Vinca rosea) alkaloids: A new class of stathmotinetic agents. Acta Genet. Med. (Roma) 17, 197 (1968)
11. Cardinali, G., Cardinali, G. and M.A. Enein: Studies on the Antimitotic Activity of Leucocristine (VCR). Blood 21, 1, 102 (1963)
12. Creasey, W.A. and Marwik, M.E.: Biochemical aspects of the vinca alkaloids. II: A comparison of the effects of Colchisine, Vinblastin and Vincristine on the synthesis of ribonucleic acids in Ehrlich ascites cells. Biochem. biophys. Acta (Aust.) 87, 601 (1964)
13. Cutts, J.H.: Changes in mitosis in ascites tumors and normal bone marrow induced by Vincaleukoblastine in vivo. Cancer Ca. Conf. 4, 363 (1961)
14. Dustin, P.jr.: Some observations on the cytological effects of antimitotic poisons. Acta genet. med. (Rome) 17, 182 (1968)
15. Eckler, E.: Nebenwirkungen der VCR-Behandlung. Internationales Symposium über die Anwendung der Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristine, 13./14. Mai 1968 in Frankfurt a.M., Urban & Schwarzenberg, hrsg. v. Dr.E.Gmachl, Gießen 1969, S.214
16. Evans, A., S.Farber, S.Bernet and P.J.Mariano: Vincristine in the Treatment of acute Leukemia in Children. Cancer, Vol.16, 10, 1302 (1963)
17. Fusenig, N.E. und Obrecht, P.: Der Wirkungsmechanismus der Vinca-Alkaloide. Internationales Symposium über die Anwendung der Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristine, 13./14. Mai 1968 in Frankfurt a.M., Urban & Schwarzenberg, hrsg. v. Dr.E.Gmachl, Gießen 1969, S.141
18. Gebhart, E., Schwanitz, G. und Hartwich, G.: Zytogenetische Wirkung von Vincristin auf menschliche Leuko-

zyten in vivo und in vitro.

Internationales Symposium über die Anwendung der  
Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristine, 13./14.  
Mai 1968 in Frankfurt a.M., Urban & Schwarzen-  
berg, hrsg.v. Dr.E.Gmachl, Gießen 1969, S.2366

19. George, P., Journey, L.J. and Goldstein, M.N.: Effect of  
vincristine on the fine structure of He La  
cells during mitosis.  
J. Nat. Can. Inst. 35, 355 (1965)
20. Gerhartz, H.: Diskussionsbeitrag. Internationales Sympo-  
sion über die Anwendung der Vinca-Alkaloide  
Velbe und Vincristin. 13./14. Mai 1968 in  
Frankfurt a.M., Urban & Schwarzenberg, hrsg.v.  
Dr. E.Gmachl, Gießen 1969, S. 221
21. Halpern, B., Robineaux, R., Kourilski, R., Lépanay, A.,  
Liacopoulos-Briot, M.: Étude morphodynamique  
et ultrastructurale de la stimulation  
lymphocytaire par la phyto-hémagglutinine.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 50: 1059 (1968)
22. Hartwich, G., Becker, J. und Fuchs, H.-F.: Behandlung  
tumorbedingter Einflußstauungen mit Vincristin-  
sulfat.  
Fortschritte der Med. 87, 401 (1969)
23. Johnson, J.S., Wright, H.F., Svoboda, G.H. and Vlantis, J.:  
Anti-tumor principles derived from Vinca rosea  
Linn. I.: Vincaleukoblastine and leurosine.  
Cancer Res. 20, 1016 (1960)
24. Karon, M.R.: Leucocristine Sulfate in the Treatment of  
Acute Leukemia.  
Proc. Am. A. Cancer Res., 3, 333 (1962)
25. Karon, M.R., Freireich, E.J. and Frei, E.: A Preliminary  
Report on Vincristine Sulfate - A New Active  
Agent for the Treatment of Acute Leukemia.  
Pediatrics, 30, 791 (1962)
26. Klein, H.O., Lennartz, K.L. und Gross, R.: Partielle  
Synchronisation der Tumorzellproliferation  
und zellphasenspezifisches "Timing" der  
Zytostatikagabe. Erste klinische Ergebnisse

bei lymphoretikulären Tumoren, akuten Leukosen sowie Bronchialkarzinomen.

Leukämien und maligne Lymphome, Urban & Schwarzenberg, 1973, S. 251

27. Lampert, F.: Morphologische und quantitativ-cytochemische Veränderungen der normalen menschlichen Knochenmarkszellen durch Cytostatika.  
Z. Ges. Exp. Med. 144, 189 (1967)
28. Lettré, H.: Antitumoral Effects of Vinca Rosea Alkaloids.  
Excerpta Med. Found. 106, 43 (1966)
29. Madoc-Jones and F. Mauro: Interphase Action of Vinblastine and Vincristine: Differences in Their Lethal Action Through the Mitotic Cycle of Cultured Mammalian Cells.  
J. Cell. Physiol., 1972
30. Malawista, S.E.: Vinblastine: Colchicine-like effects on human blood leukocytes during phagocytosis.  
Blood 37, 519 (1971)
31. Manvernay, R.A.: Vinca rosea L. Cytostatikum?  
Österreich. Apothekerzeitung 13, 182 (1962)
32. Marmont, A.: Die Behandlung maligner Bluterkrankungen mit vinca-rosea-Alkaloiden.  
11. Tag. dt. Hämat. Kongr. Innsbruck 1965, S. 53
33. Marmont, A., Damasio, E.: The effects of two Alkaloids derived from Vinca Rosea on the malignant Cells of Hodgkin's Disease, Lymphosarcoma and Acute Leukemia in vivo.  
Blood, 29, 1 (1967) S. 21
34. Marmont, A., Damasio, E., Rossi, F.: The stathmokinetic effect of the vinca rosea (*Catharanthus roseus*) alkaloids in Hodgkin's disease and in the acute leukaemias.  
Internationales Symposium über die Anwendung der Vinca-Alkaloide  
Velbe und Vincristin. 13./14. Mai 1968 in Frankfurt am Main. Urban & Schwarzenberg, herausgegeben von Dr. E. Gmachl, Gießen 1969, S. 17

35. Morasca, L., Rainisio, C. and Masera, G.: Duration of Cytotoxic Activity of Vincristine in the Blood of Leukemic Children.  
Europ. J. Cancer, 5, 79, Pergamon Press (1969)
36. Neuss, N., Gorman, M., Boaz, H.E. and Cone, N.J.: Vinca Alkaloids. XI. Structures of Leucocristine (LCR) and Vincaleucoblastine (VLB).  
J. Am. Chem. Soc., 84, 1509 (1962)
37. Obrecht, P. und Kendel, K.: Zur Klinik und Pathophysiologie der VCR-Wirkung am Nervensystem.  
Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde 196 (1969), S. 43
38. Ohme, H. und Eschenbach, C.: Die Behandlung von akuten Leukämien mit Vincristinsulfat.  
Dt. Med. Wschr. 89, 1208 (1964)
39. Schubert, J.C. und Martin, H.: Vinca-Leukoblastin. Therapie der Lymphogranulomatose.  
11. Tag. Dt. Hämatol. Ges., Innsbruck 1965, S. 17
40. Siebs, W.: Mitoseablaufstörungen. III. Mitteilung. Zur Wirkung von Vincaleukoblastin auf normale und maligne Zellen in vitro.  
Z. Zellenforschung 61, 231 (1963)
41. Siegenthaler, W. und Feine, U.: Ionisierende Strahlen-Teilkörperbestrahlung einzelner Organe.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970, S.991
42. Slater, L.M., Wainer, R.A. and Serpiek, A.: VCR neurotoxicity with hyponatremia.  
Cancer 23, 122 (1969)
43. Storti, E., Traldi, A., Quaglino, D.: Clinical Studies on the Effect of Imuran and Vincristine in Treatment of Leukaemia.  
Acta Geneticae et Gemellologiae 17, 1, Roma (1968)

44. Svoboda, G.H.: Alkaloide of *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus*). IX. Extraction and Characterization of Leucozidine and Leucocristine.  
*Lloydia* 24, 173 (1961)
45. Svoboda, G.H., Johnson, J.S., Svoboda, G.H. and Wright, H.F.: Experimental Basis for Clinical Evaluation of Two New Alkaloids from *Vinca rosea* Linn.  
*Proc. Am. A. Cancer Res.* 3, 331 (1961)
46. Tritsch, H. and Pappas, A.: Mitoseblockade in der Epidermis durch VCR-Sulfat.  
*Klin. Wschr.* 48, 950 (1970)
47. Vaitjevicius, V.: Diskussionsbeitrag 24. Internationales Symposium über die Anwendung der *Vinca*-Alkaloide Velbe und Vincristin.  
13./14. Mai 1968 in Frankfurt am Main.  
Urban & Schwarzenberg, herausgegeben von Dr. E. Gmachl, Gießen 1969, S. 61
48. Valeriote, F.A. et al.: An in vitro essay for growth-inhibilitating activity of vinblastine.  
*J. Natl. Ca. Inst.* 35, 851 (1965)
49. Wilms, K. und Wilmanns, W.: Permanentkulturen lymphoblastärer Zellen als Modellsystem zur Untersuchung des Wirkungsmechanismus anti-leukämischer Substanzen.  
79. Tagg. Dt. Ges. Inn. Med., Wiesbaden 1973, Nr. 358



### Lebenslauf

Am 27.10.1943 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. med Wolfgang Albert und seiner Ehefrau Dr. med.dent. Annemarie Albert geb. Rietschel in Dresden geboren.

Nach dem Besuch der Grund- und Oberschule machte ich 1963 in Berlin das Abitur. Nach einjährigem Studienaufenthalt in den USA begann ich im Sommersemester 1964 das Studium der Zahnmedizin an der Freien Universität Berlin.

Nach abgelegtem Physikum 1967 und Staatsexamen 1970 bin ich nach 2 1/2-jähriger Assistenzzeit seit 1973 als selbständige Zahnärztin in einer Praxisgemeinschaft in Berlin-Tiergarten tätig.





